

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Schwerpunkt Endokrinologische Forschung

Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

# **Evaluation Melanocortin-2-Rezeptor abhängiger Effekte auf das Fettgewebe in einem *in vivo* Modell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Andreas Sauter**

aus

München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mussack  
Prof. Dr. Daniel Teupser

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Slawik

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	Übergewicht – Epidemiologie, Einteilung und Ursachen .....	- 1 -
1.2	Lipidstoffwechsel und Lipotoxizität .....	- 3 -
1.3	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse .....	- 5 -
1.4	ACTH-abhängige Effekte <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	- 6 -
1.5	Generierung von genetisch veränderten Mäusen .....	- 10 -
1.5.1	Einführung.....	- 10 -
1.5.2	Transgene Mäuse.....	- 10 -
1.5.3	Gene targeting und <i>knock-out</i> Mäuse .....	- 11 -
1.5.4	Das Cre-lox-System .....	- 12 -
1.5.5	Generierung von Cre-lox Mäusen .....	- 15 -
1.6	Zielsetzung der Arbeit .....	- 18 -
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>- 19 -</b>
2.1	Material .....	- 19 -
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	- 19 -
2.1.2	Geräte .....	- 23 -
2.1.3	Puffer und Lösungen .....	- 25 -
2.1.4	Primersequenzen .....	- 25 -
2.1.4.1	Primer für PCR.....	- 25 -
2.1.4.2	Primer für qRT-PCR .....	- 27 -
2.2	Methoden.....	- 29 -
2.2.1	Mäuse .....	- 29 -
2.2.1.1	Haltung .....	- 29 -
2.2.1.2	Entnahme und Lagerung von Gewebe .....	- 29 -
2.2.2	DNA-Isolation .....	- 30 -
2.2.2.1	Aus Mäuseschwanzbiopsien .....	- 30 -
2.2.2.2	Genotypisierung von Embryonen.....	- 30 -
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 31 -

2.2.3.1	Optimierung der PCR-Bedingungen mittels Gradientencyclers .....	- 32 -
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	- 32 -
2.2.5	RNA-Extraktion .....	- 33 -
2.2.5.1	RNA-Extraktion aus Nebennieren .....	- 34 -
2.2.5.2	RNA-Extraktion aus Fettgewebe.....	- 34 -
2.2.5.3	RNA-Extraktion aus Zellkultur-Zellen .....	- 35 -
2.2.6	Messung der RNA- und DNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie ...	- 35 -
2.2.7	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) .....	- 36 -
2.2.8	Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	- 36 -
2.2.9	Zellkultur .....	- 39 -
2.2.9.1	Primärkultur aus Nebennieren.....	- 39 -
2.2.9.2	Mouse Embryonic Fibroblast (MEFs).....	- 39 -
2.2.9.3	Differenzierung von MEFs zu Adipozyten und anschließende Stimulation...- 41 -	
2.2.10	Lipolyse-Messung .....	- 42 -
2.2.11	Proteinkonzentrationsmessung .....	- 42 -
2.2.12	Paraffineinbettung von Gewebe .....	- 43 -
2.2.13	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	- 43 -
2.2.14	Analyse von gefärbten Paraffinschnitten des subcutanen Fettgewebes .....	- 44 -
2.2.15	Corticosteron-Messung .....	- 44 -
2.2.16	ACTH-Messung .....	- 45 -
2.2.17	Verarbeitung der Rohdaten .....	- 46 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>- 47 -</b>
3.1	Analyse und Zucht der transgenen Mäuse .....	- 47 -
3.2	Versuch der exakten TV-Lokalisierung .....	- 57 -
	Abb. 3.9: Primerpositionen zur Lokalisierung des TV (loxP-MC2-R-loxP) .....	- 58 -
3.3	Untersuchung der Nebennieren; Corticosteron- und ACTH-Messung .....	- 58 -
3.4	Analyse des subcutanen und viszeralen Fettgewebes .....	- 62 -
3.5	Analyse von MEFs und daraus differenzierten Adipozyten .....	- 69 -

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 74 -</b>
4.1	Modell .....	- 74 -
4.1.1	Gründe für die fehlerhafte homologe Rekombination .....	- 74 -
4.1.2	Alternative Methoden zur Überprüfung der homologen Rekombination .....	- 74 -
4.1.3	Möglichkeiten und Grenzen des entstandenen Mausmodells .....	- 76 -
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	- 77 -
4.2.1	Genexpression in den Nebennieren, Corticosteron- und ACTH-Produktion..	- 77 -
4.2.2	Analyse des subcutanen und viszeralen Fettgewebes .....	- 79 -
4.2.3	MEFs und daraus differenzierte Adipozyten .....	- 81 -
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>6</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....</b>	<b>- 87 -</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>- 90 -</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>- 102 -</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>- 103 -</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Übergewicht – Epidemiologie, Einteilung und Ursachen

Übergewicht stellt in der heutigen Gesellschaft ein erhebliches gesundheitliches, wirtschaftliches und soziales Problem dar. Die aktuellen Daten zum Übergewicht in der Bevölkerung sind alarmierend. So waren im Jahr 2009 in Deutschland 60% der Männer, 43% der Frauen und 15% der Kinder (3-17 Jahre) übergewichtig oder adipös, wenn man der Berechnung den *body mass index* (BMI) zugrunde legt [1,2]. Der BMI berechnet sich nach folgender Formel:  $BMI = [\text{Körpergewicht (kg)}] / [\text{Körpergröße (m)}]^2$ . Danach gelten Personen mit BMI-Werten von 18,5-25 kg/m<sup>2</sup> als normalgewichtig und mit Werten unter- bzw. oberhalb als unter- bzw. übergewichtig. Ab einem BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> spricht man von Adipositas, welche wiederum nach dem BMI in drei Schweregrade eingeteilt wird. Der BMI ist leicht zu erheben. Es gibt allerdings auch Situationen, in denen ein hoher BMI nicht krankhaft ist. So weisen auch Sportler mit großer Muskelmasse einen hohen BMI auf, ohne dass in diesen Fällen von einer Adipositas gesprochen werden kann. Darüber hinaus scheint das viszerale Fettgewebe in der Pathogenese von kardiovaskulären und metabolischen Begleiterkrankungen eine größere Rolle zu spielen als anderes Fettgewebe [3]. Aus diesen Gründen sollte bei einem BMI von 25 kg/m<sup>2</sup> und darüber der Taillenumfang gemessen werden. Ab einem Umfang von 88 cm (Frauen) bzw. 102 cm (Männer) liegt eine abdominelle Adipositas vor [4]. Andere Möglichkeiten zur Diagnostik von Übergewicht sind die Messung des Quotienten aus Bauch- zu Hüftumfang, des Quotienten aus Bauchumfang zu Körpergröße oder des Körperfettgehalts. Dabei dient nur letztgenannter Parameter zur Quantifizierung der vorhandenen Fettmenge.

Die Ursachen für Übergewicht sind vielfältig. Die wichtigsten belegten auslösenden Faktoren sind Überernährung und verminderte Alltagsaktivität, welche zu einer positiven Energiebilanz und damit zur Gewichtszunahme beitragen. Es gibt darüber hinaus zahlreiche weitere Faktoren, dazu zählen eine genetische Prädisposition, Medikamentennebenwirkungen (z.B. Antidepressiva wie selektive Serotonin-Reuptake-Hemmer), Stress und Krankheiten wie beispielsweise eine Schilddrüsenunterfunktion. Neben den genannten individuellen Gründen spielen auch soziokulturelle Umstände eine Rolle, da Übergewicht gehäuft in Industrienationen vorkommt. Hier ist der Anteil von Übergewichtigen in höheren sozialen Schichten geringer als in niedrigeren [2].

Viele Zivilisationskrankheiten wie Arthrose sind entweder direkt durch Übergewicht bedingt oder damit assoziiert. Insbesondere ab einem BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> und bei Vorliegen einer abdominellen Adipositas steigt das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, welche in

Deutschland die häufigste Todesursache darstellen, stark an [5]. Auch für zahlreiche weitere Erkrankungen stellt die Adipositas einen wesentlichen Risikofaktor dar. Insbesondere die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II und einer arteriellen Hypertonie, aber auch die Krebsentstehung, scheinen zumindest teilweise durch Adipositas bedingt zu sein [6]. Ein Zusammenhang besteht auch zu neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer [7]. Nicht zu vernachlässigen sind neben den körperlichen auch die psychischen Folgen der Adipositas. Häufig fühlen sich vor allem stark übergewichtige Personen als Außenseiter und erfahren berufliche Nachteile.

Zusätzlich zu den persönlichen gesundheitlichen Folgen hat die Adipositas auch enorme volkswirtschaftliche Konsequenzen. Durch medizinische Behandlung, Arbeitsausfall und Renten (Erwerbsunfähigkeit, Berufsunfähigkeit) werden Gesundheits- und Sozialsystem sowie Unternehmen mit Milliardenbeträgen belastet. In Deutschland wurden die Kosten der Adipositas im Jahr 2003 auf ca. 13 Milliarden Euro geschätzt und könnten laut *World Health Organization* (WHO) auf 25,7 Milliarden Euro im Jahr 2020 ansteigen [8,9].

Die Adipositas stellt damit für das Gesundheitswesen ein zentrales und allgegenwärtiges Problem dar. In der Behandlung sind nach wie vor Maßnahmen am effektivsten, welche die Energiebilanz negativ beeinflussen. Dies kann durch eine Reduktion der Energiezufuhr sowie durch eine Steigerung des Energieumsatzes erreicht werden. Es gibt viele Strategien, um die Energiezufuhr einzuschränken. Dazu zählen die Reduktion des Fettverzehr, der Ersatz von Mahlzeiten durch Formulaprodukte sowie eine Ernährungsumstellung im Sinne einer mäßig energiereduzierten Mischkost, was als Standardtherapie der Adipositas angesehen wird [10-12]. Zur Steigerung des Energieverbrauchs dient eine Bewegungstherapie, welche der Gewichtsreduktion dient und insbesondere für die Stabilisierung eines reduzierten Gewichtes wichtig ist [13]. Um die Patientenmotivation zu steigern und Rückfälle zu vermeiden gibt es darüber hinaus verhaltenstherapeutische Ansätze [14]. In Ausnahmefällen kommen chirurgische Optionen wie die Anlage eines Magenbandes oder eines Magenbypasses sowie die Schaffung eines Schlauchmagens zur Anwendung, wodurch starke Gewichtsreduktionen möglich sind [15,16]. Allerdings stellen solche Operationen drastische und risikobehaftete Maßnahmen dar, weshalb sie nur bei Versagen der konservativen Therapie in Betracht gezogen werden sollten.

Momentan gibt es nur ein Medikament, das zur Behandlung von Adipositas zugelassen ist. Dabei handelt es sich um Orlistat, welches über eine Reduktion der Fettresorption im Darm wirkt [17]. Andere Wirkstoffe wie sog. Appetitzügler wurden wegen erheblicher - teilweise lebensbedrohlicher - Nebenwirkungen vom Markt genommen [18,19]. Wirkstoffe, die direkt

am Fettgewebe angreifen, gibt es bisher nicht. Dies ist darauf zurückzuführen, dass viele Mechanismen, die zu Entwicklung und Aufrechterhaltung von Übergewicht führen, trotz der großen Bedeutung gar nicht oder nur teilweise verstanden sind. Im Folgenden soll ein Überblick über den heutigen Kenntnisstand des physiologischen und des pathologischen Fettstoffwechsels gegeben werden.

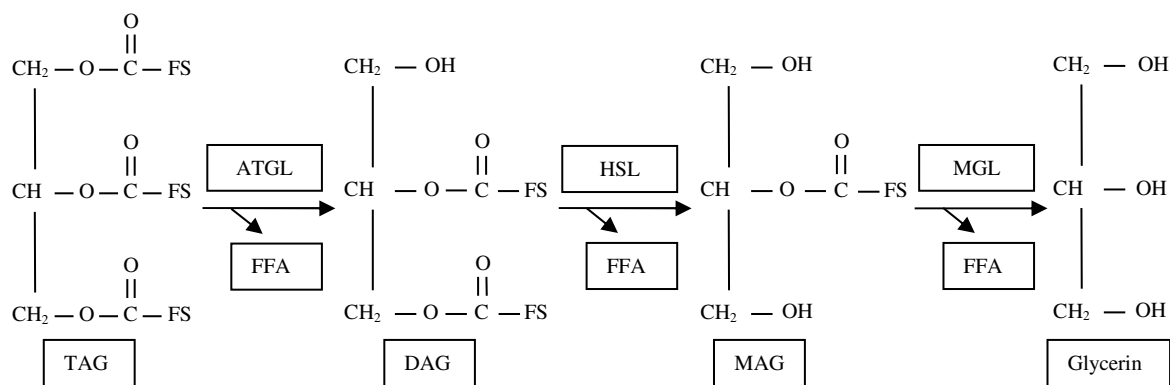
### 1.2 Lipidstoffwechsel und Lipotoxizität

Das Fettgewebe wird in weißes und braunes Fettgewebe unterteilt und ist für alle Säugetiere lebenswichtig. Weißes Fettgewebe hat seine Hauptfunktion in der Energiespeicherung (Depot- bzw. Speicherfett). Dieses macht je nach Individuum 10% (schlanke bzw. sportliche Personen) bis 50% (stark Übergewichtige) des Körpergewichts aus. Bei Normalgewichtigen liegt der Anteil am Körpergewicht bei 15-25%. Neben diesem Speicherfett dient das weiße Fettgewebe als Baufett zum Schutz vor mechanischer Belastung (z.B. Fußsohle, Gesäß, Nierenlager) sowie zur Isolierung. Braunes Fettgewebe stellt bei manchen Tieren und auch bei Säuglingen eine wichtige Wärmequelle dar [20].

Das Gewicht des Speicherfettes wird durch das Verhältnis von Lipidsynthese zu Lipolyse bestimmt. Ein Energieüberschuss aufgrund von Überernährung (z.B. hochkalorische Nahrung oder vermehrte Nahrungsaufnahme) oder wegen eines reduzierten Energieverbrauches (z.B. ungenügende Bewegung) führt zur Zunahme des Fettgewichts und damit zur Entwicklung von Übergewicht [21]. Das vermehrte Fettgewicht resultiert dabei einerseits aus Hypertrophie vorhandener Adipozyten und andererseits aus Adipozytenneogenese [22].

Bei Bedarf werden aus den im weißen Fett gespeicherten Triacylglyceriden (TAG) freie Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) freigesetzt. Diese werden im Körper vor allem zur Synthese von Zellmembranen sowie zur Energiegewinnung, aber z.B. auch zur Hormonsynthese verwendet. Die Menge der FFA im Blut wird vor allem durch die Lipase-abhängige Hydrolyse von TAG-Speichern im weißen Fettgewebe bestimmt, die dabei zu Glycerin und FFA abgebaut werden (s. Abb. 1.1) [23]. Das erste und auch geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Kaskade der TAG-Lipolyse ist die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), die eine Fettsäure von TAG abspaltet, sodass ein Diacylglycerid (DAG) verbleibt [24]. Dieses wird durch die Hormon-sensitive Lipase (HSL) hydrolysiert, wodurch eine weitere Fettsäure freigesetzt wird [25]. Das verbleibende Monoacylglycerid (MAG) wird durch die Monoacylglyceridlipase (MGL) in die eine weitere Fettsäure sowie Glycerin gespalten [26]. Die so freigewordenen Fettsäuren können u.a. zur Energiegewinnung im Rahmen der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation sowie zum Einbau in Membranen genutzt werden.





**Abb. 1.1: Abbau von Triacylglyceriden [27]**

FS = Fettsäurerest; Erklärung s. Text

Ein Ungleichgewicht zwischen TAG-Synthese und -Hydrolyse im Sinne erhöhter FS-Spiegel ist eng mit der Entwicklung einer Insulinresistenz sowie einer Abnahme der  $\beta$ -Zellfunktion vergesellschaftet, da erhöhte Fettsäurespiegel im Blut zu einer erhöhten Fettaufnahme und -Speicherung im Pankreas führen und dieses dadurch schädigen [28]. Die Insulinresistenz ist ein Kriterium des metabolischen Syndroms und kann zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II beitragen [29]. Studienergebnisse legen nahe, dass eine Reduktion der TAG-Hydrolyse durch die Hemmung der ATGL im Fettgewebe und die damit verbundene Abnahme des FFA-Spiegels im Blut die Glukosetoleranz und Insulinresistenz verbessern und somit auch das Fortschreiten der damit verbundenen Folgeerkrankungen verlangsamen können [30].

Es konnte gezeigt werden, dass die Speicherkapazität des Fettgewebes limitiert ist und dass ein Überschreiten dieser Grenze zu einer Anhäufung von Fetten (insbesondere von TAG) in anderen Organen führt, was in diesen eine Funktionsstörung zur Folge hat. Diese Schädigung bezeichnet man als Lipotoxizität, wobei die genauen zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht verstanden sind [31-34]. Die Komplikationen der Lipotoxizität sind vielfältig und hängen vom jeweiligen Gewebe sowie von Menge und Art der gespeicherten Lipide ab [35]. Folgen können u.a. eine Insulinresistenz mit der Entwicklung eines metabolischen Syndroms bzw. eines Diabetes mellitus Typ II, eine Arteriosklerose mit der Manifestation einer arteriellen Verschlusskrankheit an Herz, Gehirn oder Extremitäten sowie eine Fettleber sein [21,31-34]. Obwohl mit der Palmitinsäure ein bedeutender Vertreter der schädlichen Fettsäuren gefunden zu sein scheint, sind die Mechanismen, die zu den beschriebenen Schädigungen führen, weiter unklar [36,37].

Die Lipolyse wird durch zahlreiche pro- und antilipolytische Hormone reguliert. Zu den wichtigsten Vertretern der prolipolytischen Hormone zählen dabei Adrenalin, Noradrenalin,

Glukokortikoide und Glukagon. Insulin ist das wichtigste antilipolytisch wirkende Hormon. Ebenfalls antilipolytisch wirkt das Protein Perilipin, welches die Oberfläche der Lipidtropfen in Adipozyten umhüllt und diese so vor der HSL und damit vor dem Abbau schützt [38]. Daneben gilt die Stärke der Perilipinexpression als Anhaltspunkt für die vorhandene Fettmenge. Unklar sind bisher die genauen Signalwege der Lipolyse. Lediglich der katecholamin- und insulininduzierte Signalweg sind weitestgehend bekannt [24].

### 1.3 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Die Energiehomöostase unterliegt zentralen Steuerungsvorgängen und Rückkopplungsmechanismen. Ein wesentlicher Bestandteil in diesem System ist die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse). Eine wichtige Aufgabe der HHN-Achse ist die Anpassung des Organismus an physische und psychische Belastungssituationen durch eine vermehrte Ausschüttung von Stresshormonen [40].

Der Hypothalamus spielt für den Körper durch Steuerung der Homöostase (Blutdruck, Temperatur und Osmolalität), der circadianen Rhythmik, des Sexualverhaltens sowie der Nahrungs- und Wasseraufnahme eine zentrale Rolle. Dem im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildeten Corticotropin-*releasing* Hormon (CRH) kommt eine wesentliche Steuerungsfunktion zu [41]. Dieses Hormon gelangt über die Hypophysenpfortadern zur Adenohypophyse. Diese ist trotz ihrer Lage und Funktion im Gegensatz zum Hypophysenhinterlappen kein Teil des zentralen Nervensystems sondern entsteht aus epithelialen Anteilen des Rachendaches (Rathke'sche Tasche). CRH bewirkt in den basophilen Zellen der Adenohypophyse die Bildung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) [41,42]. ACTH wird aus der Vorstufe Proopiomelanocortin (POMC) durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Bei der Spaltung entsteht neben ACTH auch  $\beta$ -Lipotropin sowie  $\gamma$ -MSH. ACTH kann weiter zu  $\alpha$ -MSH (wichtigstes Melanotropin) sowie zum *corticotropin-like intermediate peptide* (CLIP) prozessiert werden, aus  $\beta$ -Lipotropin können  $\beta$ -Endorphin,  $\gamma$ -Lipotropin sowie  $\beta$ -MSH entstehen [43].

ACTH gelangt über die Blutgefäße zur Nebenniere. Während das Nebennierenmark als Teil des sympathischen Nervensystems Adrenalin und Noradrenalin aus chromaffinen Zellen ins Blut abgibt, ist die Nebennierenrinde (NNR) für die Produktion von Steroidhormonen verantwortlich. Die Produktion der verschiedenen Steroidhormone erfolgt in drei funktionell getrennten Zonen. Die äußere *Zona glomerulosa* bildet Aldosteron, welches eine vermehrte Wasser- und Natriumrückresorption in der Niere bewirkt. In der mittleren *Zona fasciculata* werden Glukokortikoide gebildet (zur Funktion s.u.). Die innere *Zona reticularis* bildet

Androgene, v.a. Dehydroepiandrosteron, welches dann zu Testosteron und Estrogen umgewandelt werden kann [44,45].

ACTH ist ein Agonist der Melanocortinrezeptoren. In der Nebenniere wird v.a. in der *Zona fasciculata* der Melanocortin-2 Rezeptor (MC2-R) exprimiert. Die Bindung von ACTH an diesen Rezeptor führt zur Ausschüttung von Glukokortikoiden, also Stresshormonen. Beim Menschen ist dies im wesentlichen Cortisol, bei Mäusen - aufgrund des Fehlens des Enzyms 17 $\alpha$ -Hydroxylase - Corticosteron. Das Fehlen dieses Enzyms führt zudem dazu, dass bei Mäusen in der Nebennierenrinde keine Androgene gebildet werden können [46].

Glukokortikoide werden wie alle Steroidhormone aus Cholesterin synthetisiert und sind deshalb lipophil, weshalb sie direkt (ohne Rezeptorbindung) ins Zellinnere diffundieren können. Dort binden sie an zytoplasmatische Glukokortikoidrezeptoren. Diese Bindung führt dazu, dass sich Hemmpoteine (sog. *heat-shock-proteins*) von den Glukokortikoidrezeptoren lösen, woraufhin diese in den Zellkern wandern. Dort können sie selbst als Transkriptionsfaktor wirken oder die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren modulieren, wodurch die Expression verschiedener Gene verändert wird.

Im Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel haben Glukokortikoide eine katabole Wirkung. Sie fördern die Transkription von Glukoneogeneseenzymen und somit die Glukoneogenese. In der Muskulatur werden vermehrt Aminosäuren abgebaut, die ebenfalls zur Glukoneogenese verwendet werden können. Darüber hinaus wird die Transkription von  $\beta$ 2-Rezeptoren im Fettgewebe verstärkt. Da an  $\beta$ 2-Rezeptoren lipolytisch wirkende Katecholamine binden, wird die Lipolyse indirekt durch Glukokortikoide verstärkt.

Im Herz- Kreislaufsystem führen Glukokortikoide über eine erhöhte Katecholaminempfindlichkeit zu einer Steigerung der Herzkraft und zur Vasokonstriktion. Des Weiteren steigern Glukokortikoide die Ausschüttung von Adrenalin und Angiotensinen.

Darüber hinaus wirken Glukokortikoide immunsuppressiv indem sie mit anderen Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- $\kappa$ B) wechselwirken und so die inflammatorische Wirkung dieser Transkriptionsfaktoren hemmen [47,48].

### 1.4 ACTH-abhängige Effekte *in vivo* und *in vitro*

Neben dem Melanocortin-2-Rezeptor (MC2-R) sind vier weitere Melanocortinrezeptoren bekannt. Melanocortinrezeptoren werden durch verschiedene Melanotropine bzw. ACTH aktiviert und haben jeweils unterschiedliche Expressionsorte und Funktionen (s. Tab. 1.1) [49].

<b>Rezeptor</b>	<b>Expressionsorte</b>	<b>Agonisten</b>	<b>Funktion</b>
<b>MC1-R</b>	Melanozyten	$\alpha$ -MSH, ACTH	Hautpigmentierung
<b>MC2-R</b>	Nebennierenrinde, Fettgewebe	ACTH	ACTH-Freisetzung, Einfluss auf das Fettgewebe (?)
<b>MC3-R</b>	Gehirn, Darm, Plazenta	$\gamma$ -MSH, $\alpha$ - MSH ACTH	Energiehomöostase, Fiebersenkung
<b>MC4-R</b>	Gehirn, Darm, Plazenta	$\alpha$ -MSH, ACTH	Energiehomöostase, Fiebersenkung, Sexualverhalten
<b>MC5-R</b>	Exokrine Drüsen	$\alpha$ -MSH, ACTH	Talgsekretion

**Tab. 1.1: Die Melanocortinrezeptoren: wichtige Agonisten und Funktionen**

Bei allen Melanocortinrezeptoren handelt sich um  $G_{\alpha s}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren, die ihre Wirkung über eine steigende Konzentration des *second messenger* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und der Proteinkinase A-Konzentration vermitteln [49].

Der MC2-R ist der einzige Melanocortinrezeptor, dessen spezifischer und einziger Agonist ACTH ist. Daher wird der MC2-R auch als ACTH-Rezeptor bezeichnet [50]. Er wird hauptsächlich in der *Zona fasciculata* der NNR exprimiert und bewirkt dort die ACTH-vermittelte Freisetzung von Glukokortikoiden [51].

Zusätzlich zur NNR gibt es einige weitere Expressionsorte des MC2-R, zu denen auch das braune und weiße Fettgewebe zählt [52]. Hier ist allerdings über seine physiologische Funktion wenig bekannt. *In vitro* führt eine ACTH-Stimulation von Adipozyten durch eine Aktivierung von ATGL und HSL zu einem substantiellen Anstieg der Lipolyse [53,54]. Darüber hinaus wird vermutet, dass der MC2-R eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von weißem Fettgewebe spielt, da die Expression des MC2-R in Präadipozyten gering ist aber während der Adipogenese stark ansteigt [55]. Promotoranalysen legen einen zusätzlichen Einfluss von CCAAT/enhancerbindenden (C/EBPs) Proteinen sowie von  $PPAR\gamma$  auf die ACTH-abhängige Regulation der Adipogenese nahe [55,56]. Neben den dargelegten *in vitro* Daten gibt es auch *in vivo* Untersuchungen, die auf einen direkten Einfluss hypophysärer Hormone auf das Fettgewebe hindeuten. Bei Mäusen mit einem *knock-out*-bedingten Fehlen aller  $\beta$ -Rezeptoren wurden während des Fastens erhöhte FFA-Spiegel im Blut beobachtet, die aber aufgrund der

fehlenden  $\beta$ -Rezeptoren nicht durch Adrenalin oder Noradrenalin vermittelt sein konnten (bzgl. *knock-out* s. Kap. 1.5.3) [57]. Somit müssen neben Katecholaminen auch andere Hormone einen signifikanten Einfluss auf die Lipolyse haben, wobei ACTH als ein möglicher Kandidat angesehen wird.

Bei adipösen Personen wurde eine erhöhte ACTH-Konzentration im Blut nachgewiesen, die möglicherweise durch gesteigerte FFA-Spiegel bedingt ist. Damit im Einklang stehen auch Befunde, nach denen eine pharmakologische Inhibition der Lipolyse durch Acipimox (einem Nikotinsäurederivat) die pathologisch gesteigerte ACTH Sekretion normalisieren kann [58]. Diese Ergebnisse würden darauf hindeuten, dass die ACTH-Sekretion durch FFA stimuliert wird. Allerdings hat im Gegensatz dazu eine Injektion von Fettsäuren bei gesunden Personen eine Senkung der ACTH-Konzentration im Blut zur Folge [59]. Somit ist auf den ersten Blick die Wirkung von FFA auf die ACTH-Sekretion bei normalgewichtigen und fettleibigen Individuen entgegengesetzt und die Wirkung von FFA auf die ACTH-Freisetzung nicht abschließend geklärt. Allerdings gibt es auch noch andere Faktoren, welche die ACTH-Freisetzung beeinflussen. Beispiele dafür sind die Hormone Leptin und Adiponektin. Es handelt es sich hierbei um Peptide, die aus Adipozyten freigesetzt werden und einen wichtigen Einfluss auf die Energiehomöostase, das Hungergefühl und die Entstehung von Übergewicht haben. Dabei spielt Leptin die bedeutendere Rolle [60].

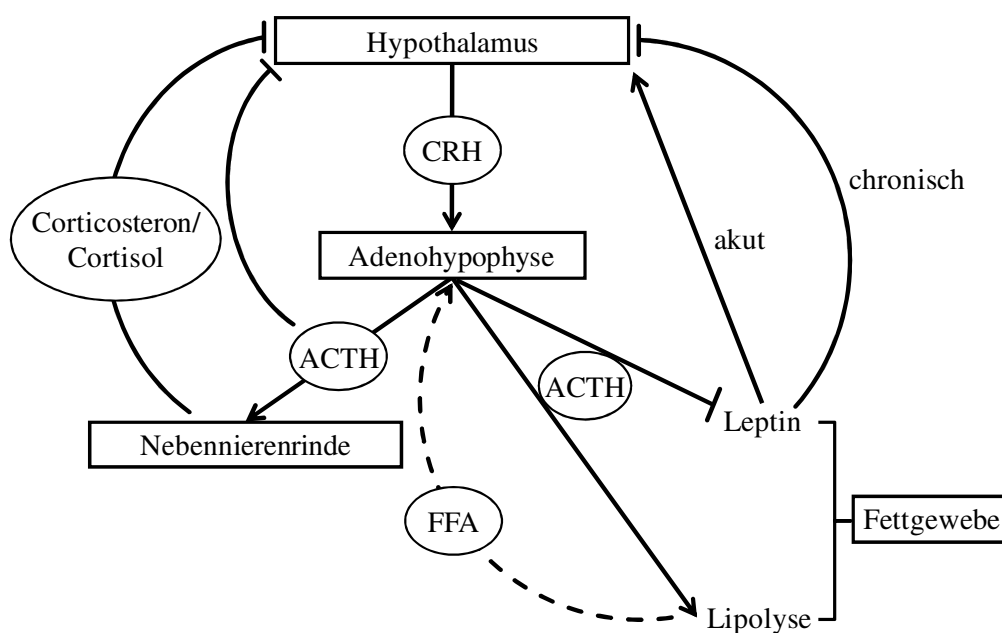
Leptin wurde 1994 bei der Untersuchung von extrem adipösen Mäusen entdeckt, welche aufgrund einer Mutation im Leptin-Gen eine Leptin-Defizienz aufwiesen [61]. Durch zahlreiche Studien konnte belegt werden, dass Leptin aus dem Fettgewebe freigesetzt wird und durch verschiedene Mechanismen für das Sättigungsgefühl verantwortlich ist. Die Abwesenheit von Leptin führt zu einer unkontrollierten Nahrungsaufnahme [62,63]. Es wurde allerdings gezeigt, dass bei adipösen Personen der Leptin-Spiegel im Blut nicht vermindert ist, sondern dass eine Leptinresistenz besteht und der Leptinspiegel sogar erhöht ist [64]. Dadurch hat sich die anfängliche Euphorie, durch Leptin-Gaben Übergewicht heilen oder vermindern zu können, relativiert.

Mittlerweile wurden neben der Fettmasse zahlreiche weitere Einflussfaktoren auf den Leptinspiegel im Blut gefunden. So senken vor allem Fastenperioden aber auch Testosteron, Schlafmangel und körperliche Aktivität das Leptinniveau, wohingegen es durch Östrogen und psychischen Stress erhöht wird [62,65-67]. Über die Interaktion mit dem Melanocortinsystem gibt es bislang noch kein abschließendes Modell, allerdings zahlreiche Hinweise.

Bei *in vitro* Experimenten an Fettgewebe von Leptin-*knock-out*-Ratten, die zahlreiche Eigenschaften des metabolischen Syndroms zeigen, konnte eine verminderte ACTH-

vermittelte Lipolyse nachgewiesen werden [68]. Weitere *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass physiologische ACTH-Spiegel die Expression von Leptin-mRNA sowie die Leptinfreisetzung dosisabhängig um bis 30% senken können [69,70]. Des Weiteren gibt es einen direkten negativen Rückkopplungsmechanismus von ACTH auf die Leptinsekretion, wie an adrenaletomierten Mäusen gezeigt werden konnte [71]. Bei Menschen wurde nachgewiesen, dass Leptin pulsatil ca. alle 30 Minuten ausgeschüttet wird und dass die ACTH- und Cortisolspiegel im Blut dazu eine inverse Beziehung zeigen, die nicht der Glukokortikoid-gesteuerten Hemmung der Leptin-Sekretion zuzuschreiben ist [72]. Diese Effekte sind ACTH-spezifisch und gelten nicht für andere aus POMC stammende Hormone [70]. Normalerweise steigt beim Fasten der ACTH- und Glukokortikoidspiegel im Blut. Bei Mäusen kann dieser Anstieg durch die Injektion von Leptin unterdrückt werden, was wiederum auf die Interaktion zwischen HHN-Achse und Fettgewebe hindeutet [72,73].

In Zusammenschau dieser Daten wurde ein möglicher Regelkreis postuliert, bei welchem ACTH die Leptin-Sekretion hemmt, was wiederum die ACTH-Sekretion senkt [74]. Möglicherweise gibt es jedoch einen Unterschied zwischen der oben genannten chronischen Langzeitwirkung und der akuten Kurzzeitwirkung von Leptin auf die ACTH-Sekretion, da eine andere Studie einen Leptin-vermittelten ACTH-Anstieg nach wenigen Stunden gezeigt hat [74,75].



**Abb. 1.2: Die HHN-Achse sowie die Wirkung von FFA und Leptin**

→ Stimulation; —| Hemmung; - -> fragliche Wirkung

### 1.5 Generierung von genetisch veränderten Mäusen

#### 1.5.1 Einführung

Die Hausmaus (*Mus musculus*) stellt einen wichtigen Modellorganismus für Forschungszwecke dar. Nach der Entdeckung der Mendel'schen Gesetze im Jahr 1900 wurden die Erkenntnisse der Vererbungslehre zur Generierung von Inzuchtstämmen angewandt. Der erste Inzuchtstamm wurde 1909 von C.C. Little etabliert. Er und W. Castle gelten als Pioniere der Verwendung von Mäusen als Versuchstiere, die damals vor allem in der Krebs- und Chemikalienforschung eingesetzt wurden [76,77]. Auch einer der heute am weitesten verbreitete Mausstämme C57BL/6 wurde von Little im Jahr 1921 gezüchtet. Weitere bekannte Stämme sind der NOD-Stamm, der in der Diabetesforschung eingesetzt wird sowie die Nacktmaus, die sich durch das Fehlen von Thymus (und damit des Immunsystems) und Körperbehaarung auszeichnet und in der Tumorforschung eine entscheidende Rolle spielt [78,79].

Auch heute wird die Kreuzung nach Mendel für die Verpaarung von Mäusen eingesetzt, um gewünschte Genotypen, wie beispielsweise für ein Merkmal homozygote Mäuse, zu züchten. Diesem Kreuzungssystem liegt das Prinzip zugrunde, dass statistisch bei der Verpaarung von zwei heterozygoten Mäusen jeweils 25% Wildtypmäuse und homozygote Mäuse sowie 50% heterozygote Mäuse entstehen. Auch für die vorliegende Arbeit wurde das beschriebene Kreuzungssystem verwendet (s. Kap. 3.1).

#### 1.5.2 Transgene Mäuse

Unter einer „transgenen Maus“ versteht man eine Maus, deren Genom künstlich eingebrachte Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthält. Dabei werden zusätzliche Kopien eines bestimmten Gens in die Maus-DNA eingebracht, um die Wirkung einer Überexpression dieses Gens untersuchen zu können. Die zusätzlichen Kopien des Gens werden dabei an einer zufälligen Stelle ins Genoms integriert und enthalten neben dem eigentlichen Gen auch noch eine Promotorsequenz [80]. Da die Fremd-DNA an zufälliger Stelle eingebaut wird, hängt die Expressionsstärke auch von Genom-eigenen Regulationsmechanismen ab und kann somit bei verschiedenen transgenen Mausstämmen unterschiedlich stark ausfallen [81]. Um die Fremd-DNA in das Mausgenom integrieren zu können, werden zunächst Oozyten durch *in vitro* Fertilisation befruchtet und die Fremd-DNA durch Mikroinjektion in die so gewonnenen embryonalen Stammzellen eingebracht, was als Transfektion bezeichnet wird [82].

Die Zellen werden in Blastozysten überführt und daraufhin in scheinchwangere Muttertiere implantiert. Die Nachkommen werden mittels Southern-Blot auf eine erfolgreiche Transfektion untersucht. Ist diese nachgewiesen, enthalten die Tiere die veränderte DNA in jeder Körperzelle

(also auch in Karyozyten) und können somit zur weiteren Zucht von Tieren mit derselben Veränderung verwendet werden. Die ubiquitäre Expression des Gens stellt allerdings auch ein Problem dar, da eine beobachtete Wirkung auf ein Gewebe immer auch durch Einflüsse des Gens im ganzen Körper bedingt sein kann und es so schwierig ist, den isolierten Einfluss auf das jeweilige Gewebe exakt festzustellen. Außerdem kann eine transgene Überexpression während der Embryogenese zu Entwicklungsstörungen und früher Sterblichkeit führen. Um eine gewebspezifische Überexpression oder Ausschaltung eines Gens zu erreichen eignen sich beispielsweise gewebspezifische Rekombinasen (s. Kap 1.5.4).

### 1.5.3 Gene targeting und *knock-out* Mäuse

Neben der Möglichkeit zur Generierung von transgenen Mäusen, bei denen zusätzliche DNA ungezielt im Genom eingebaut wird, gibt es auch die Möglichkeit des *gene targeting*. Das *gene targeting* dient zur gezielten Modifikation eines Gens. Eine Anwendungsmöglichkeit ist die Erzeugung von *knock-out* Mäusen. Diese Methode wurde erstmals von Capecchi, Smithie und Evans beschrieben, wofür die Autoren im Jahr 2007 den Nobelpreis für Medizin erhielten [83].

Unter *gene targeting* versteht man ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem ein bestimmter Bereich der Wildtyp-DNA durch Fremd-DNA ersetzt wird, wozu der Mechanismus der homologen Rekombination genutzt wird [84]. Homologe Rekombination bedeutet, dass ein künstlich eingebrachter DNA-Strang einen Genom-Abschnitt ersetzt. Dazu muss die künstliche Nukleotidsequenz der ursprünglichen mit Ausnahme einer meist kleinen Mutation sehr ähnlich sein. Der mutierte Anteil des Gens zerstört oder mutiert die Funktion des Gens. Die veränderte Nukleotidsequenz bezeichnet man als *Targeting-Vektor* (TV) und es sind mehrere Schritte notwendig, um diesen ins Mausgenom zu integrieren. Der TV wird zunächst in Bakterien repliziert und draufhin durch verschiedene Verfahren (u.a. Calcium-Phosphat-Präzipitation, Mikroinjektion, Elektroporation) in murine embryonale Stammzellen eingebracht, die in Zellkultur vermehrt wurden. Aufgrund der großen Ähnlichkeit nähern sich die DNA des TV und des Genoms parallel an. Nun kann es zu einem *crossing over* kommen, dabei werden die Nukleotidsequenzen ausgetauscht (homologe Rekombination). Dieser Vorgang geschieht aber nur bei einem Anteil von  $1:10^5$ - $10^9$  Zellen. Die genauen Gründe für die große Variabilität der Häufigkeit ist nicht restlos geklärt [85]. Unter anderem hängt diese vom gewählten Gen, der Struktur des jeweiligen TV und der Expression des Gens ab. Der TV ist typischerweise mit einer Neomycin-Resistenzkassette ausgestattet, die eine Resistenz gegen das normalerweise zelltoxische Antibiotikum Geneticin vermittelt [86]. Durch Behandlung aller Zellen mit Geneticin werden diejenigen, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat und die somit durch die Resistenzkassette geschützt sind, selektioniert [87]. Um sicherzugehen, dass



die homologe Rekombination auch an der richtigen Stelle eingetreten ist, werden die selektionierten Zellen anschließend noch mittels Southern-Blot oder PCR untersucht. Nachdem erfolgreich transfizierte embryonale Stammzellen gefunden wurden, können diese in Blastozysten injiziert und in Muttertieren ausgetragen werden. Die geborenen Tiere tragen die eingebrachte Mutation normalerweise nur auf einem Chromosom, sind also heterozygot für die genetische Veränderung. Um homozygote Tiere zu erhalten, müssen diese Tiere gekreuzt werden, sodass bei der Verpaarung von zwei heterozygoten Tieren 25% der Nachkommen homozygot für die Mutation sind.

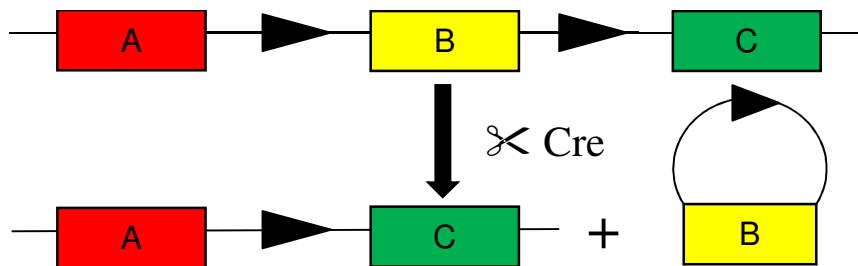
Mit dem *knock-out* eines Gens kann dessen funktionelle Bedeutung untersucht werden, indem man Wildtyp- und *knock-out*-Typ vergleicht [88]. Auch hier gilt, dass zunächst aus heterozygoten Tieren (bei denen die Funktion des Gens nicht komplett ausgeschaltet ist) homozygote Tiere gekreuzt werden müssen, welche einen vollständigen *knock-out* aufweisen. Ein ähnliches Problem wie bei transgenen Mäusen besteht auch bei beschriebenen *knock-out* Tieren: der Funktionsverlust des Gens ist nicht gewebsspezifisch und immer vorhanden. Es kann also nicht beurteilt werden, ob beobachtete Veränderungen durch Störungen in der Entwicklung, Einflüsse des Genverlustes auf den ganzen Organismus oder durch gewebsspezifische Veränderungen bedingt sind. Ein weiteres Problem besteht darin, dass homozygote Tiere teilweise nicht überlebensfähig sind und deshalb unter Umständen schon intrauterin absterben. Eine mögliche Lösung für die beschriebene Problematik ist die Entwicklung von induzierbaren, gewebsspezifischen *knock-outs*, wobei das Cre-lox-System die bekannteste und etablierteste Methode darstellt [89,90].

### 1.5.4 Das Cre-lox-System

Das Cre-lox-System wurde im Jahr 1987 von Sauer entwickelt und diente ursprünglich der vorübergehenden (konditionellen) Aktivierung einer Genüberexpression [91,92]. Durch Gu wurde die Anwendung für das konditionelle *gene targeting* beschrieben [93]. Ziel des Systems ist es, einen essentiellen Teil des Gens (beispielsweise ein Exon) mit loxP-sites zu flankieren, sodass dieser durch die Cre-Rekombinase entfernt werden kann. Dadurch wird die Funktion des Gens zerstört, also ein *knock-out* generiert.

Die Rekombinase Cre (*causes recombination*) stammt aus dem Bakteriophagen P1 und erkennt spezifisch die Nukleotidsequenz loxP (*locus of crossing over P1*). Eine loxP-site ist eine 34 Basenpaare (bp) lange Sequenz, die aus einer 8 bp langen Kernsequenz, flankiert von zwei jeweils 13 bp langen palindromischen Sequenzen, besteht [94,95]. Die Cre-Rekombinase erkennt loxP-sites durch Bindung an den beiden palindromischen Sequenzen und schneidet anschließend die DNA an den Kernsequenzen beider loxP-sites. Der dazwischenliegende

Bereich wird entfernt und die verbliebene DNA neu verknüpft, wobei eine loxP-site im Genom verbleibt (s. Abb. 1.3: **Cre-vermittelte Mutation**) [96]. Das entfernte Genfragment enthält die zweite loxP-site und wird hier verknüpft. Dadurch entsteht ein zirkuläres Produkt, welches in der Zelle abgebaut wird.



**Abb. 1.3: Cre-vermittelte Mutation**

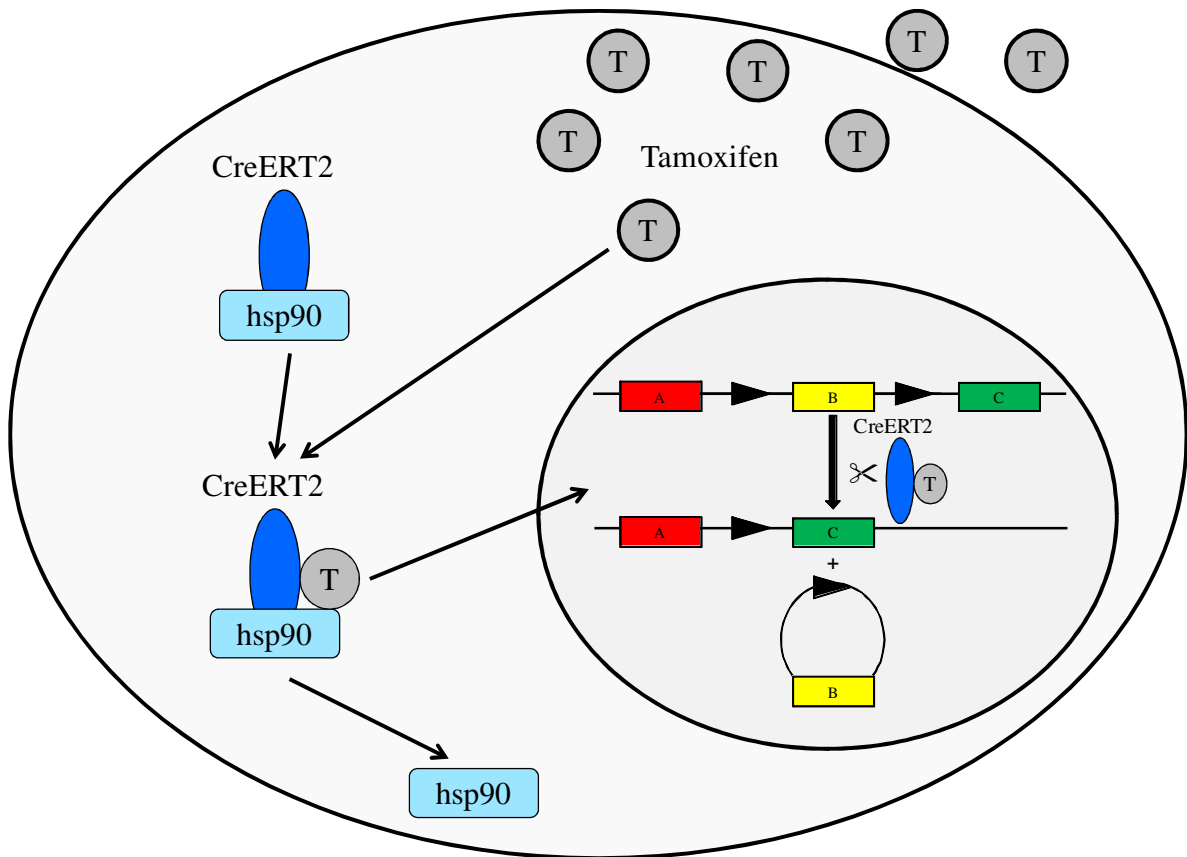
Die Cre-Rekombinase schneidet DNA an loxP-sites (►), entfernt den dazwischenliegenden Bereich („B“) und verknüpft die DNA anschließend an den loxP-sites neu.

Die Nukleotidsequenz der loxP-sites lautet

5' - ATA ACTTCGTATA - GCATACAT - TATACGAAGTTAT - 3'.

Dabei sind die beiden 13 bp langen Randsequenzen palindromisch (d.h. sie weisen gegenläufig dieselbe Sequenz auf) und flankieren eine 8 bp lange Kernsequenz (GCATACAT). Da der Kernbereich der loxP-sites im Gegensatz zu den Randbereichen nicht palindromisch ist, müssen die Kernbereiche beider loxP-sites in gleicher Orientierung vorliegen, da es ansonsten nicht zu einer Entfernung sondern zu einer Inversion der DNA kommt. Die loxP-sites sowie die Cre-Rekombinase müssen künstlich in das Genom eingebracht werden. Hierzu dienen o.g. Methoden zur Generierung transgener und homolog rekombinierter Tiere (s. Kap. 1.5.2, 1.5.3). Versieht man die Cre-Rekombinase mit einem geeigneten Promotor und umgibt das Wildtyp-Gen mit loxP-sites, so wird dieses gewebsspezifisch durch die aktivierte Cre-Rekombinase entfernt. Ein Beispiel für einen gewebsspezifischen Promotor ist das *adipocyte protein 2* (aP2), auch als *fatty acid binding protein 4* (FABP4) bezeichnet. Dieses wird vor allem in Adipozyten exprimiert. Eine mit einem aP2-Promotor versehene Cre-Rekombinase kommt demnach nur im Fettgewebe vor, was gewebsspezifische *knock-outs* möglich macht [97]. Allerdings wird aP2 auch in Makrophagen, Kardiomyozyten und dendritischen Zellen exprimiert und ist deshalb kein vollkommen fettgewebsspezifisches Protein [98]. Adiponektin hingegen wurde als sehr spezifisches Fettgewebsprotein identifiziert [99,100]. In jüngster Zeit ist es auch gelungen, dieses als Cre-Promotor zu nutzen, wodurch fettgewebsspezifische Cre-lox-System basierende Modifikationen möglich werden [101].

Neben der Möglichkeit einer Gewebe-abhängigen Aktivierung gibt es auch die Option einen zeitlich bestimmbar *knock-out* zu generieren, indem man eine induzierbare Cre-Rekombinase verwendet [102-104]. Hier beruht die Aktivierung nicht auf der Bindung eines gewebsspezifischen Proteins an den entsprechenden Promotor, sondern auf einer veränderten Cre-Rekombinase, die mit einem Tamoxifen-spezifischen Steroidrezeptor fusioniert wird. Die Fusion aus Cre-Rekombinase und Tamoxifenrezeptor wird als CreERT2 bezeichnet [103]. Steroidrezeptoren werden konstitutiv exprimiert und sind daher immer im Zellinneren vorhanden, können aber erst nach Aktivierung durch das entsprechende Steroid in den Zellkern gelangen. Diese Eigenschaft beruht darauf, dass alle Steroidrezeptoren an *heat-shock-proteins 90* (hsp90) gekoppelt sind, die verhindern, dass der Rezeptor in den Zellkern wandert. Erst nach Bindung des entsprechenden Liganden dissoziieren hsp90 vom Rezeptor, sodass der Rezeptor in den Zellkern translozieren kann. Wird eine Cre-Rekombinase an einen Steroidrezeptor gekoppelt, so wird durch die Translokation des Steroidrezeptors auch die daran gebundene Rekombinase in den Zellkern gebracht, sodass diese auf die DNA zugreifen kann. Als Ligand wird das Östrogen-Analogon Tamoxifen verwendet, welches für die Behandlung von Mammakarzinomen entwickelt wurde [105]. Die Cre-Rekombinase wird erst nach Tamoxifen-Applikation aktiv und der gewünschte DNA-Abschnitt daraufhin entfernt (s. Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Tamoxifen-induzierte Cre-Rekombinase**

Die CreERT2-Rekombinase ist immer im Zytoplasma vorhanden, kann jedoch nicht auf die im Zellkern befindliche DNA zugreifen. Nach der Bindung von Tamoxifen dissoziieren CreERT2 und hsp90, sodass Rezeptor und Rekombinase in den Zellkern translozieren. Hier kann daraufhin die Rekombinase aktiv werden, welche die DNA an den entsprechenden Stellen schneidet und wieder zusammenfügt.

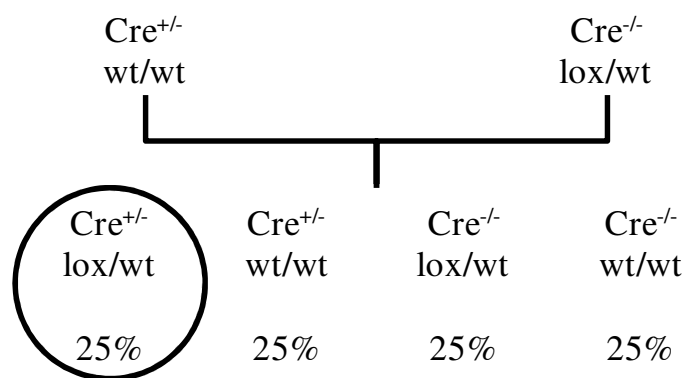
Neben dem Cre-lox-System gibt es auch äquivalente Systeme mit anderen Rekombinasen und Schnittstellen. Ein Beispiel hierfür ist das FLP-*frt*-System. Hier erkennt die FLP-Rekombinase *frt-sites* und schneidet an diesen Stellen äquivalent zur Cre-Rekombinase an *loxP-sites*. Die FLP-Rekombinase stammt aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [106,107]. Die *frt-sites* weisen genau wie *loxP-sites* eine von zwei palindromischen Randsequenzen flankierte Kernsequenz auf (5' - GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC - 3').

### 1.5.5 Generierung von Cre-lox Mäusen

Um eine Maus zu generieren, die mit Hilfe des Cre-lox-System im Sinne eines induzierbaren *knock-outs* verändert werden kann, sind mehrere Schritte nötig.

## Einleitung

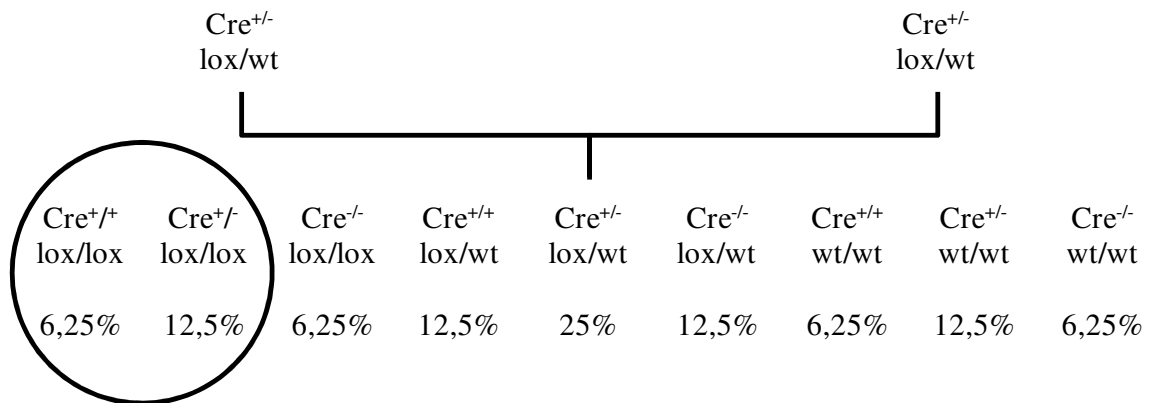
Zum einen muss ein relevanter Teil des zu deaktivierenden Gens (beispielsweise ein Exon) von loxP-sites umgeben werden. Dabei ist es wichtig, dass das Gen vor der Cre-Aktivierung nicht in seiner Funktion eingeschränkt wird, also Wildtyp-Eigenschaften aufweist. Zum anderen benötigt man ein Tier, welches die (induzierbare) Cre-Rekombinase trägt. Verpaart man diese Tiere, so erhält man zu 25% Nachkommen, welche sowohl die Cre-Rekombinase, als auch das loxP-flankierte Gen auf jeweils einem Allel tragen ( $Cre^{+/-};lox/wt$ ) (s. Abb. 1.5). Für einen *knock-out* ist es essentiell, dass beide Allele des Gens die gewünschte Veränderung beinhalten. Daher müssen Tiere, die sowohl Cre- als auch loxP-positiv sind, erneut verpaart werden. Aus dieser Kreuzung erhält man rechnerisch zu 18,75% Tiere, die einerseits die Cre-Rekombinase exprimieren ( $Cre^{+/-}$  oder  $Cre^{+/+}$ ) und andererseits für das loxP-flankierte Gen homozygot ( $lox/lox$ ) sind. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob die Tiere die Cre-Rekombinase auf einem ( $Cre^{+/-}$ ) oder beiden Allelen ( $Cre^{+/+}$ ) tragen (s. Abb. 1.6). Ein mögliches Kreuzungsschema zeigen die folgenden Abbildungen 1.5 und 1.6.



**Abb. 1.5: Verpaarung von  $Cre^{+/-}$ - mit lox/wt-Tieren, um  $Cre^{+/-};lox/wt$  Tiere zu erhalten**

Dargestellt sind jeweils die Genotypen der Parental- und Filialgeneration sowie die bei der Kreuzung zu erwartenden Anteile des jeweiligen Genotyps an allen Nachkommen.

Bei der Verpaarung dieser Tiere erhält man zu 25% Tiere mit dem gewünschten Genotyp, diese tragen die Cre-Rekombinase und das entsprechende Gen ist heterozygot von loxP-sites umgeben.



**Abb. 1.6: Verpaarung von Cre<sup>+/-</sup>;lox/wt Tieren, um Cre<sup>+</sup>;lox/lox Tiere zu erhalten**

Dargestellt sind jeweils die Genotypen der Parental- und Filialgeneration sowie die bei der Kreuzung zu erwartenden Anteile des jeweiligen Genotyps an allen Nachkommen.

Die in Abb. 1.5 erhaltenen Tiere werden erneut verpaart um Cre<sup>+</sup>;lox/lox Tiere zu erhalten.

Der Anteil solcher Tiere an allen Nachkommen beträgt rechnerisch 18,75%.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der MC2-R wird in Adipozyten exprimiert. In der Präadipozyten-Zelllinie 3T1-L1 wurde gezeigt, dass der MC2-R die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten sowie die Lipolyse fördert [20,41-43,108]. Diese an Zelllinien erhobenen Ergebnisse müssen allerdings durch physiologische *in vitro* und *in vivo* Systeme weiter untermauert werden, um ihre funktionelle Bedeutung zu klären. Über die Wirkung des MC2-R auf Adipozyten, die aus Mausstammzellen differenziert wurden, und auch über seine Funktion auf das Fettgewebe *in vivo* ist bislang wenig bekannt. Deshalb sollte ein Mausmodell mit einem induzierbaren MC2-R *knock-out* generiert werden und das Fettgewebe sowie die Adipozyten *in vivo* und *in vitro* charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die indirekte Wirkung auf die Nebennieren nach Ablation des Rezeptors im Fettgewebe untersucht werden.

Im Laufe des Projekts belegten Ergebnisse, dass ein *knock-out* des MC2-R aufgrund einer erwarteten Rekombination während der Generierung der embryonalen Stammzellen in diesem Tiermodell nicht möglich sein würde und es stattdessen zu einer Insertion des MC2-R im Genom gekommen war. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde dieses Tiermodell charakterisiert. Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Weisen die genetisch veränderten Mäuse, bei denen der MC2-R-Locus von loxP-sites umgeben ist, nach der Kreuzung mit Cre-Mäusen die gewünschten Merkmale auf?
- 2) Hat die Anwesenheit eines zusätzlichen Allels des MC2-R im Genom Auswirkungen auf die Expression von Genen der Steroidhormonbiosynthese in den Nebennieren und deren endokrine Aktivität?
- 3) Welche Wirkung hat die erhöhte Expression des MC2-R auf das Fettgewebe *in vivo*?
  - a) Gibt es einen Einfluss auf das Gewicht des Fettgewebes?
  - b) Kann man für etwaige Unterschiede ein Korrelat im Sinne einer Veränderung der Genexpression finden?
- 4) Welchen Einfluss hat der MC2-R auf differenzierte murine Adipozyten *in vitro*?
  - a) Wird die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten beeinflusst?
  - b) Gibt es Unterschiede in der Expression von Genen des Fettstoffwechsels?
- 5) Welche Schlussfolgerungen können aus den Ergebnissen der durchgeführten Experimente gezogen werden und können diese als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Verbrauchsmaterialien**

---

12-Loch Lochplatte	Fa. BD, Heidelberg
24-Loch Lochplatte	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
6-Loch Lochplatte	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch Mikrotiterplatte	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
ACTH	Fa. Defiante Farmacêutica, Funchal, Portugal
ACTH ELISA	Fa. Biomerica, Irvine, USA
Agarose	Fa. Peqlab, Erlangen
Aqua ad iniectabilia (a.d.)	Fa. Braun, Melsungen
bFGF	Fa. Invitrogen, Darmstadt
Borat	Fa. Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. Sigma, Steinheim
Chloroform	Fa. Merck, Darmstadt
Corticosterone HS EIA	Fa. IDS, Frankfurt am Main
Deckgläser	Fa. Mezel, Braunschweig
Dexamethason	Fa. Sigma, Steinheim
<i>Dilution-Buffer</i>	Fa. Promega, Mannheim
DMEM	Fa. Invitrogen, Darmstadt
DMSO	Fa. Sigma, Steinheim
DNA-Größenmarker <i>low range</i> /1kb	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot
Dnase I (SV Total RNA Isolation System)	Fa. Promega, Mannheim
dNTPS (100mM)	Fa. Promega, Mannheim

---



## Material und Methoden

EDTA	Fa. Sigma, Steinheim
Einbettkassette	Fa. Neolab, Heidelberg
Einstreu, Typ Lignocel	Fa. J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg
Einwegklinge SEC 35	Fa. Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Eisessig	Fa. Merck, Darmstadt
Eosin	Fa. Sigma, Steinheim
Ethanol (30%/50%/70%/95%)	Fa. SAV LP, Flintsbach a. Inn
Ethidiumbromid	Fa. Roth, Karlsruhe
EVA-Green Mastermix	Fa. Promega, Mannheim
FCS	Fa. Invitrogen, Darmstadt
Filterpapier 0,2µm	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Formaldehyd 37%	Fa. Merck, Darmstadt
<i>Free Glycerol Reagent</i>	Fa. Sigma, Steinheim
Gaskatuschen (Butan)	Fa. Apragaz, Brüssel, Belgien
Gelantine	Fa. Biochrome, Berlin
Glas Pasteur-Pipette	Fa. Brand, Wertheim
Glutamin	Fa. Invitrogen, Darmstadt
Glutaraldehyd	Fa. Sigma, Steinheim
GoTaq DNA Polymerase (3 units/µl)	Fa. Promega, Mannheim
Green GoTaq Reaction Buffer 5x	Fa. Promega, Mannheim
Hämatoxylin	Fa. Sigma, Steinheim
HBSS	Fa. Invitrogen, Darmstadt
IBMX	Fa. Sigma, Steinheim
Igepal CA-630	Fa. Sigma, Steinheim

## Material und Methoden

Insulin	Fa. Braun, Melsungen
Insulinspritze (29G)	Fa. BD, Heidelberg
iProof 5x Reaction Buffer	Fa. Bio-Rad, München
iProof DNA Polymerase	Fa. Bio-Rad, München
Isofluran	Fa. Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Fa. Merck, Darmstadt
Kanülen 22G/27G	Fa. BD, Heidelberg
Kollagenase II	Fa. Sigma, Steinheim
Loading-dye	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Lysis-Buffer</i> (SV Total RNA Isolation System)	Fa. Promega, Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase	Fa. Promega, Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase Puffer	Fa. Promega, Mannheim
NaCl	Fa. Fa. Merck, Darmstadt
Noradrenalin	Fa. Sanofi-Aventis, Frankfurt
Nuklease-freies Wasser	Fa. Promega, Mannheim
Objektträger	Fa. Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Ohrmarken	Fa. Hauptner, Dietlikon-Zürich, Schweiz
Oil Red I	Fa. Sigma, Steinheim
OligodT	Fa. Promega, Mannheim
Paraffin	Fa. Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Parafilm	Fa. Pechiney Plastic Packaging, Chicago
PBS	Fa. Invitrogen, Darmstadt
PCR-Gefäße	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Klebefolie für 96-Lochplatte	Fa. Sarstedt, Nümbrecht

## Material und Methoden

PCR-Platte 96-Loch	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Penicillin/Streptomycin	Fa. Invitrogen, Darmstadt
Perfusionsspritze 50ml	Fa. BD, Heidelberg
Petrischalen 90mm	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Fa. Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Fa. Sigma, Steinheim
Pipettenspitzen mit/ohne Filter	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Proteinase K (20mg/ml)	Fa. Fermentas, St. Leon-Rot
Reaktionsgefäße 0,5ml/1,5ml/2ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Richard Allan Scientific Mounting Medium	Fa. Thermo Fisher Scientific, Walldorf
RNaseZap®	Fa. Ambion, Darmstadt
RNAasin	Fa. Promega, Mannheim
Rosiglitazon	Fa. Glaxo Smith Klein, München
Roti-Quant universal Reagenz 1	Fa. Roth, Karlsruhe
Roti-Quant universal Reagenz 2	Fa. Roth, Karlsruhe
SDS	Fa. Sigma, Steinheim
Serologische Pipette 5ml/10ml/25ml/50ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Skalpellklingen	Fa. Martor, Solingen
SV Total RNA Isolation System	Fa. Promega, Mannheim
Tierfutter ssniff R/M-H	Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Tris	Fa. Sigma, Steinheim
Trizol	Fa. Qiagen, Hilden
Trockeneis	Fa. TKD, Fraunberg-Tittenkofen
Trypsin	Fa. Invitrogen, Darmstadt

## Material und Methoden

Xylol	Fa. Baxter, Unterschleißheim
Zellsieb 70µm	Fa. BD, Heidelberg
Zentrifugenröhre 15ml/50ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.2 Geräte

Abzug	Fa. Köttermann, Uetze/Hänigsen
Autoklav	Fa. Systec, Wettenberg
Biofuge fresco	Fa. DJB labcare, Buckinghamshire, England
Co2 Inkubator	Fa. Sanyo, München
Einbettautomat STP 120	Fa. Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Färbekasten mit Färbegestell	Fa. Omnilab, Bremen
Feinwaage BD121S/BD 2100	Fa. Sartorius, Göttingen
Fluorometer DELFIA 1234	Fa. Wallac, Turku, Finnland
Gel iX Imager	Fa. Intas, Göttingen
Gelelektrophorese-Kammer	Fa. Bio-Rad, München
Gradientencycler PTC-200	Fa. MJ Research, St. Bruno, Kanada
HLC Heiz-Blockthermostat-2-131	Fa. Ditabis, Pforzheim
Mauskäfig 1144B	Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg
Mauskäfig 1291H Eurostandard Type III H	Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg
Mikrotom HM 325	Fa. Thermo Fisher Scientific, Walldorf
MX 3000 P qRT-PCR Maschine	Fa. Stratagene, Waldbronn
Nano-drop 1000	Fa. Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer improved	Fa. Roth, Karlsruhe
Paraffin-Ausgießstation EC 350 mit Kühleinheit EC 350-2	Fa. Thermo Fisher Scientific, Walldorf

## Material und Methoden

pH-Sonde	Fa. WTW, Weilheim
Pipette 1-10µl;2-20µl;10-100µl;100-1000µl	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer (serologische Pipetten): accu-jet	Fa. Brand, Wertheim
Platwasher	Fa. Wallac, Turku, Finnland
Power-Pac 1000 Stromquelle	Fa. Bio-Rad, München
Primus 25 PCR-Maschine	Fa. Peqlab, Erlangen
Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Fa. Eppendorf, Hamburg
Trinkflasche Mausekäfig	Fa. Tecniplast, Hohenpeißenberg
Ultra-Turrax Homogenisator	Fa. IKA-Werke, Staufen
Wasserbad: The Belly Dancer	Fa. Stovall, Greensboro, USA
Zellkultur – Abzug	Fa. BDK, Reutlingen
Zellkultur-Mikroskop: DM IL LED mit Kamera EC3	Fa. Leica, Wetzlar
Zellkultur-Zentrifuge: Universa 2S	Fa. Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5810R	Fa. Eppendorf, Hamburg

## Material und Methoden

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Bouin'sche Lösung	75ml Pikirinsäure (1,2%) 25ml Formaldehyd 5ml Eisessig
Erythrozyten-Lysepuffer	0,15M NH <sub>4</sub> Cl 1mM KHCO <sub>3</sub> 0,1mM EDTA
RIPA-Puffer	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS 100ml PBS
TBE-Puffer	89mM Tris 89mM Borat 2mM EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	1mM EDTA 10mM Tris HCl für pH-Einstellung
TNES	10mM Tris 400mM NaCl 100mM EDTA 0,6% SDS

### 2.1.4 Primersequenzen

#### 2.1.4.1 Primer für PCR

Cre forward	5' - AATCGCCATCTTCCAGCAGG - 3'
Cre reverse	5' - GATCGCTGCCAGGATATACG - 3'
Flp forward	5' - TTCGAATCATCGGAAGAAGC - 3'
Flp reverse	5' - TTGCCGGTCCTATTTACTCG - 3'
loxSINE1-1	5' - AGGACCAGGGTTTGATTCCCAGCA - 3'

## Material und Methoden

---

loxSINE1-2	5' - CCCGAGTCTGTGGCTCAAATCCCT - 3'
loxSINE2-1	5' - GAGGGTGAGGTAGGAAAACCAGCC - 3'
loxSINE2-2	5' - GCCAATGTGAAGTCAGCCTGAGC - 3'
loxTV8rev	5' - TGACGTAGTGGGCGGGGACA - 3'
loxTV9rev	5' - GACGAGGGCTGTGGGGGTGA - 3'
lox-TVfor1	5' - GCCATGGTAACCAATACTCTAGA - 3'
lox-TVfor2	5' - CTGACCAGTAGTTCAGTCCCCTGA - 3'
lox-TVfor3	5' - GCCTTTCCAAGCAGAAAGCCATGGT - 3'
loxTVfor4	5' - GTGAAACTGTCATTGGGAGGCCTT - 3'
loxTVfor5	5' - AGACCCAAGCCAAGAATGTGACCA - 3'
loxTVfor5inv	5' - TCTGGGTTCGGTTCTTACACTGGA - 3'
loxTVfor6	5' - GGGGGAGTAGGGAGACTGTCAACA - 3'
loxTVfor6inv	5' - CCCCCTCATCCCTCTGACAGTTGT - 3'
loxTVfor7	5' - GCCCTCTAAGCACCTGTATAGAGCC - 3'
loxTVfor7inv	5' - CGGGAGATTCGTGGACATATCTCGG - 3'
loxTVfor8	5' - GGGGACAGAGCCTGTGGCTG - 3'
loxTVfor8inv	5' - CCCCTGTCTCGGACACCGAC - 3'
lox-TVrev1	5' - GGCCGAGTCTCTTTAAGGTTCCC - 3'
lox-TVrev2	5' - CGCACTATGGCTCGCACGGT - 3'
lox-TVrev3	5' - TGGATGGCGCCTGGTCTGCTT - 3'
loxTVrev4	5' - GGTGAACTGAGCATGCGCCTCA - 3'
loxTVrev5	5' - GCCAGCTCTCTGCCTGCAGG - 3'
loxTVrev6	5' - TCCTCCATTGGGGGCCCTGT - 3'
loxTVrev7	5' - GCTGAGGAAGGGGGTGGGGA - 3'
MC2R-fGT1	5' - TCCAATCACCCCTGAGAGGTC - 3'
MC2R-fGT2	5' - AGCCCTCCCGTATCGTAGTT - 3'
MC2R-fGT3	5' - ATCTGCAGAATTCGCCCTTA - 3'

MC2R-fGT4	5' - GCCATTCTCAAAGAGGACCA - 3'
MC2R-fGT5	5' - CAGGACCCCACTTCGTCTTA - 3'
MC2R-fGT6	5' - TTCCTTTCCTCCATTTTACCTC - 3'

#### **2.1.4.2 Primer für qRT-PCR**

18S forward	5' - CGGCTACCACATCCAAGGAA - 3'
18S reverse	5' - GTCGGAATTACCGCGGCT - 3'
ATGL forward	5' - GTGGCCAACGCCACTCACATCTAC - 3'
ATGL reverse	5' - CACGGATGGTCTTCACCAGGTTGA - 3'
Deiodinase forward	5' - TGCGCTGTGTCTGGAACAG - 3'
Deiodinase reverse	5' - CTGGAATTGGGAGCATCTTCA - 3'
HSL forward	5' - GGAGCACTACAAACGCAACGAGACA - 3'
HSL reverse	5' - CCAGAGACGACAGCACCTCAATCTC - 3'
lox-TVfor1	5' - GCCATGGTAACCAATACTCTAGA - 3'
lox-TVrev1	5' - GGCCGAGTCTCTTTAAGGTTCCC - 3'
lox-WT forward	5' - TCCCACATTGGCTGGGTAGTTGA - 3'
lox-WT reverse	5' - CGTGATGGGGTCTGGGAACCG - 3'
MC2R forward	5' - TGCCGAGAAAGATCCTACTTCAG - 3'
MC2R reverse	5' - TCCTTGGCTTTGTCACTAATGC - 3'
Perilipin forward	5' - TGGACCACCTGGAGGAAAAG - 3'
Perilipin reverse	5' - TTCGAAGGCGGGTAGAGATG - 3'
PPAR $\gamma$ 1 forward	5' - TCCTGTAAAAGCCCGGAGTAT - 3'
PPAR $\gamma$ 1 reverse	5' - GCTCTGGTAGGGGCAGTGA - 3'
PPAR $\gamma$ 2 forward	5' - GATGCACTGCCTATGAGCACTT - 3'
PPAR $\gamma$ 2 reverse	5' - AGAGGTCCACAGAGCTGATTC - 3'
P450scc forward	5' - AGGACTTTCCTGCGCT - 3'
P450scc reverse	5' - GCATCTCGGTAATGTTGG - 3'
$\beta$ 3-HSD forward	5' - AAGGAGGAATTCTCCAAGCTG - 3'



## Material und Methoden

---

β3-HSD reverse	5' - GAGCTGCAGAAGATGAAGGC - 3'
β-Actin forward	5' - ACCCGCGAGCACAGCTTCTT - 3'
β-Actin reverse	5' - TCTGGGCCTCGTCACCCACATA - 3'
StAR forward	5' - GACCTTGAAAGGCTCAGGAAGAAC - 3'
StAR reverse	5' - TAGCTGAAGATGGACAGACTTGC - 3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mäuse

#### 2.2.1.1 Haltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolge in einem 12 h/12 h Hell-/Dunkelzyklus bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 5\%$ . Die Versorgung mit Pelletnahrung und die Wasserversorgung erfolgten *ad libitum*. Die Tiere wurden in Käfigen mit autoklavierten Spänen als Einstreu, ergänzt mit Nistmaterial, gehalten. In Käfigen vom Typ I wurden maximal drei, in Käfigen vom Typ II maximal sieben Tiere gleichzeitig gehalten. Alle Untersuchungen erfolgten gemäß aktueller Tierschutzrichtlinien und nach Genehmigung durch die Regierungsbehörde.

Im Alter von 3-4 Wochen wurden die männlichen Nachkommen vom Muttertier getrennt, die weiblichen Nachkommen verblieben im Käfig. Im Zuge dessen wurde bei Bedarf auch eine Schwanzbiopsie gewonnen und dieses Gewebe für die Genotypisierung verwendet (s. Kap. 2.2.1.2)

Zur Zucht wurden Weibchen und Männchen mit passenden Genotypen im Alter von 2-18 Monaten verwendet. Dabei wurden Tiere verpaart, die einen möglichst geringen Verwandtschaftsgrad aufwiesen.

#### 2.2.1.2 Entnahme und Lagerung von Gewebe

Durch Isofluran narkotisierte Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Das Blut wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Nachdem das Blut für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 5000 rpm zentrifugiert worden war, konnte das Plasma abpipettiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Nach Auffangen des Blutes wurden die Mäuse auf einer Feinwaage gewogen.

Zur Gewebeentnahme wurden die getöteten Mäuse in Rückenlage positioniert und die Bauchseite mit Ethanol (70%) befeuchtet, um eine Kontamination und Muskelkontraktionen zu verhindern. Anschließend wurde das Abdomen mittels Bauchschnitt eröffnet. Zuerst wurde das subcutane Fettgewebe, das sich beidseits an den Oberschenkeln befindet, entnommen und ebenfalls auf der Feinwaage gewogen. Danach wurden zuerst die linke, dann die rechte Nebenniere, gefolgt von viszeralem Fettgewebe und Gonaden entnommen. Das Gewicht des viszeralen Fettgewebes wurde per Feinwaage bestimmt. Die Nebennieren wurden auf einen Objektträger überführt und mit einem Tropfen *phosphate buffered saline* (PBS) bedeckt, anschließend konnten sie unter dem Mikroskop von Fett befreit werden. Als Aufbewahrungsgefäß dienten 1,5 ml oder 2 ml Reaktionsgefäße. Gewebe, das zur RNA-

Extraktion verwendet werden sollte, wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Der Transport und die Weiterverarbeitung der Proben erfolgten auf Trockeneis. Fettgewebe, das in Paraffin eingebettet werden sollte, wurde in 30% Ethanol überführt, Gonaden zum selben Zweck in Bouin'sche Lösung. Hier konnten die Gewebe bei Raumtemperatur verbleiben.

### **2.2.2 DNA-Isolation**

#### **2.2.2.1 Aus Mäuseschwanzbiopsien**

Es wurden Schwanzbiopsien von 3-4 Wochen alten Mäusen gewonnen.

Die Mäuse wurden in einem Gefäß, in dem sich Isofluran befand, narkotisiert. Anschließend wurden 0,5-1 cm des Schwanzendes mit einer glühenden Klinge abgetrennt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die heiße Klinge wurde zum einen die Wunde kauterisiert und zum anderen eine Kontamination ausgeschlossen.

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll [109]:

Die Schwanzenden wurden 8-24 Stunden in 700 µl TNES-Puffer und Proteinase K (500 µg/ml) bei 55 °C in einem Thermomixer lysiert. Anschließend wurden 170 µl NaCl (6 M) sowie 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) zugegeben und zentrifugiert. Durch das im PCI enthaltene Phenol werden Proteine denaturiert und bilden nach Zentrifugation eine Intermediärschicht zwischen unterer Phenolschicht und oberer DNA-haltiger Schicht. Chloroform dient dazu, die Phasengrenze zu stabilisieren, Isoamylalkohol soll Schäumen verhindern.

Die obere DNA-haltige Phase (ca. 750 µl) wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurde in gleicher Menge -20 °C kaltes Ethanol (100%) zugegeben. Daraufhin konnte die DNA mithilfe einer Pasteurpipette, bei welcher die Spitze zuvor in einer Busenbrennerflamme verödet worden war, herausgezogen werden. Nach 10-minütigem Trocknen zur Entfernung des Ethanols erfolgte die Resuspension in TE-Puffer oder destilliertem Wasser. Die DNA wurde bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.2.2 Genotypisierung von Embryonen**

Bei Embryonen, aus welchen embryonale Mausfibroblasten (MEFs) generiert werden sollten, wurden die Extremitäten, der Schwanz und ein Teil des Kopfes abgetrennt und für die Genotypisierung verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte nach demselben Protokoll wie bei Mäuseschwänzen (s. Kapitel 2.2.2.1)

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) ist eine enzymatische *in vitro* Methode und dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen [110]. An die Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz binden dabei zwei gegenläufige Oligonukleotidsequenzen. Die PCR verläuft zyklisch, ein Zyklus umfasst die Denaturierung der DNA-Stränge durch Erwärmen, das Abkühlen zur Anlagerung der Primer und die DNA-Polymerisation durch eine hitzestabile Taq (*Thermus aquaticus*)-Polymerase [111]. Durch mehrere aufeinanderfolgende Zyklen (in der Regel 35-40) ist es möglich, den flankierten DNA-Bereich exponentiell zu amplifizieren.

Die PCR wird bei verschiedensten Fragestellungen angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit diente sie der Amplifikation genomischer DNA und somit dem Nachweis verschiedener Genotypen. Als Material wurde DNA verwendet, die aus Mausschwanzbiopsien oder Embryonenteilen gewonnen worden war.

<i>Green GoTaq Reaction Buffer 5x</i>	4 µl
<i>aqua destillata</i> (a.d.)	13,4 µl
dNTPS (100 mM)	0,4 µl
Primer <i>forward/reverse</i>	je 0,5 µl
GoTaq DNA Polymerase (3 <i>units</i> /µl)	0,25 µl

**Tab. 2.1: PCR-Ansatz**

Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurden jeweils 19 µl des Ansatzes in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend 1 µl DNA hinzugegeben.

Für die PCR wurde ein Primus Thermocycler der Firma Hain verwendet, dabei kamen folgende Temperaturschemata für die PCR-Reaktionen zum Einsatz:

PCR-Zyklus für die loxP/Cre-Genotypisierung:

Prädenaturierung bei 95 °C/94 °C für 2min/4min, anschließend 40/35 Zyklen mit

- (1) 30 s/60 s: Denaturierung bei 95 °C/94 °C
- (2) 30 s/45 s: Primeranlagerung bei 55 °C/58 °C
- (3) 45 s/60 s: Elongation bei 72 °C/72 °C

zuletzt 5min/4min Elongation bei 72 °C/72 °C und Lagerung bei 8 °C/8 °C

Anschließend wurden die amplifizierten Fragmente im Reaktionsgemisch mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.2.3.1 Optimierung der PCR-Bedingungen mittels Gradientencyclers

Da jedes Primerpaar eine eigene optimale Anlagerungstemperatur besitzt, muss diese zunächst bestimmt werden. Eine einfache Methode dafür ist die Verwendung eines Gradientencyclers. Dieser funktioniert wie eine gewöhnliche PCR-Maschine mit dem Unterschied, dass verschiedene Anlagerungstemperaturen gewählt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Temperaturen von 50-65 °C abgedeckt, wobei es 12 verschiedene Temperaturen in diesem Intervall gab. Anhand einer Gelelektrophorese konnte bestimmt werden, bei welchen Bedingungen diese PCR am besten funktioniert hatte.

### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient dem Auftrennen von Nukleinsäure-Strängen (DNA oder RNA) unterschiedlicher Länge [112].

Für die Herstellung eines Agarosegels musste TBE-Puffer Agarosepulver zugesetzt werden. Anschließend wurde das Gemisch bis zum Sieden erhitzt, um die Agarose zu lösen. Die flüssige Agarose wurde bis auf ca. 40°C abgekühlt, dann wurde Ethidiumbromid zugegeben (5µl/100ml TBE-Puffer). Anschließend wurde das Gemisch blasenfrei in eine Gelkammer gegossen, in die zuvor die entsprechenden Kämme eingesteckt worden waren. Die so hergestellten Gele hatten je nach Fragestellung eine Agarosekonzentration von 1-4% [109].

Das gegossene Gel wurde nach dem Abkühlen in eine Gelelektrophorese-Kammer überführt, an die eine Spannungsquelle angelegt werden kann. In der Gelelektrophorese-Kammer befand sich mit Ethidiumbromid versetzter TBE-Puffer (5 µl Ethidiumbromid/100 ml TBE-Puffer). Die Kämme wurden unter TBE-Puffer entfernt und in die so entstandenen Taschen jeweils 10 µl des PCR-Gemisches gegeben. Diesem mussten zuvor 3 µl eines *Loading-Dyes* zugegeben werden. Das darin enthaltene Glycerin bewirkt, dass das PCR-Reaktionsgemisch in die Taschen sinkt, da es eine höhere Dichte besitzt als der TBE-Puffer. Des Weiteren sind noch die

Farbstoffe Bromophenolblau und Xylen Cyanol enthalten. Diese verhalten sich wie Banden von 220 bp bzw. 3000 bp Länge, sind jedoch auch ohne UV-Licht sichtbar. So kann abgeschätzt werden, wie weit die gesuchten Banden gelaufen sind, ohne das Gel aus der Gelelektrophorese-Kammer zu entfernen. Wurde die PCR (wie in Kap. 2.2.3 beschrieben) mit dem GoTaq-Mix durchgeführt, musste kein *Loading-Dye* mehr zugesetzt werden, da schon im Puffer ein äquivalentes Produkt enthalten ist.

An die Kammer wurde eine Spannung von 60-120 V bei einer Stromstärke von 60mA angelegt. Dadurch wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Stränge in Richtung positiv geladener Anode [113]. Je kleiner das Fragment ist, desto schneller wandert es in Richtung Anode, dabei bilden gleich große Fragmente Banden. Die Spannungsgröße und Agarosekonzentration des Gels hängen von den untersuchten Sequenzen und der Größe des gegossenen Gels ab. Bei größeren Gelen verwendet man eine höhere Spannung als bei kleinen Gelen. Sind in der Probe mehrere Banden vorhanden, so benutzt man zur feineren Auftrennung Gele mit einer höheren Agarose-Konzentration und eine niedrigere Spannung, hier muss die Laufzeit entsprechend verlängert werden [114]. Ist nur eine Bande vorhanden, so kann man eine niedrigere Agarose-Konzentration und eine höhere Spannung wählen, da hier keine Bandentrennung stattfinden muss.

Das zugegebene Ethidiumbromid interkaliert mit den Nukleinsäuren, somit können die entstandenen Banden in einem UV-Transluminator unter UV-Licht (230-360 nm) sichtbar gemacht werden. Um die Größen der Banden bestimmen zu können, wurde in eine Tasche ein DNA-Größenmarker gegeben, der feste Mengen von Fragmenten bestimmter Größe enthält. An den Banden dieser Fragmente konnte man sich dann zur Größenbestimmung der übrigen Banden orientieren. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht mithilfe eines Fotografie-Dokumentationssystems (Gel iX Imager, Intas) fotografiert.

Um die Qualität extrahierter RNA beurteilen zu können, kann man diese ebenfalls auf ein Agarose-Gel auftragen. Hierzu wurde die RNA zunächst verdünnt (1 µl RNA in 10 µl a.d.) und 2 µl *Loading dye* zugegeben [115]. Nach der Auftrennung zeigen sich bei guter RNA-Qualität zwei deutlich getrennte Banden: die 28 S und 18 S-Bande der ribosomalen RNA. Bei nicht degenerierter mRNA liegt das Intensitätsverhältnis dieser Banden bei 2:1.

### 2.2.5 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA aus Geweben wurde mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt. Bei Zellen und Nebennieren kam ein Kit der Firma Promega zum Einsatz, bei Fettgewebe wurde die Trizol-Methode verwendet

Die extrahierte RNA wurde in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben, welche dann im Rahmen der q-RT-PCR (s. Kap 2.2.8) zur Quantifizierung der Genexpression verwendet wurde.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C, der Transport auf Trockeneis.

### 2.2.5.1 RNA-Extraktion aus Nebennieren

Die RNA-Extraktion aus Nebennieren erfolgte mit einem Kit (*SV Total RNA Isolation System*) und dem zugehörigen Protokoll, bis auf Ethanol waren alle Verbrauchsmaterialien im Kit enthalten [116].

Zu den Proben wurde *Lysis Buffer* gegeben, der die RNA aus den Zellen löst und stabilisiert. In diesem Puffer wurden die Nebennieren mit einem Homogenisator (Ultra Turrax, Fa. IKA-Werke) zerkleinert. Daraufhin wurde die zweifache Menge *Dilution Buffer* zugegeben, 10 min zentrifugiert und Ethanol (95%) hinzugefügt. Nach Mischen mittels Pipette wurde das Gemisch auf eine Säule überführt. Es folgten mehrere Waschschriffe mit *RNA Washing Buffer* und ein DNA-Verdau mit DNase I, anschließend konnte die RNA mit Nuklease-freiem Wasser von der Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert werden. Bei der im Anschluss durchgeführten Bestimmung der RNA-Konzentration wurden Werte von 30-200 ng/μl erreicht.

### 2.2.5.2 RNA-Extraktion aus Fettgewebe

Für die RNA-Extraktion aus Fettgewebe wurde die Trizol-Methode verwendet [117].

Bei der Trizol-Methode wurden alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der Zentrifugationen unter einem Abzug durchgeführt. Durch Trizol wird die Degradation der RNA verhindert, weshalb die Arbeiten nicht auf Eis durchgeführt werden mussten. Ein kleines Stück Fettgewebe (maximal 10 mg) wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Trizol bedeckt und mithilfe eines Homogenisators (Ultra Turrax, Fa. IKA-Werke) zerkleinert. Das Gemisch wurde zentrifugiert, die Temperatur betrug bei allen Zentrifugationsschritten der Trizol-Methode 4 °C. Nach kurzem Stehen bildeten sich drei Phasen. Die mittlere Phase wurde abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, anschließend wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln und erneuter Zentrifugation wurden erneut drei Phasen sichtbar: eine rote untere Phase, eine Interphase und eine durchsichtige obere Phase, die ca. 60% des Volumens ausmachte und die RNA enthielt. Diese Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA zu fällen wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Die RNA war nun als Pellet an der Unterseite des Reaktionsgefäßes sichtbar. Um verbliebenes Phenol zu entfernen wurde 1ml Ethanol (75%) zur RNA gegeben, zentrifugiert, und das Ethanol entfernt. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Die RNA wurde in 100 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration gemessen. Die Konzentrationen betrugen zwischen 200 und 500 ng/µl.

### 2.2.5.3 RNA-Extraktion aus Zellkultur-Zellen

Die RNA-Extraktion aus Adipozyten und Fibroblasten erfolgte mit demselben Kit wie die RNA-Extraktion aus Nebennieren (s. Kapitel 2.2.5.1). Allerdings wurden hier die Zellen nicht mit einem Homogenisator zerkleinert, stattdessen erfolgte die Zerkleinerung indem die Zellen in *Lysis Buffer* mehrmals durch die sehr feine Kanüle einer Insulinspritze gezogen wurden. Alle weiteren Schritte entsprachen der RNA-Extraktion aus Nebennieren, nachdem diese im Homogenisator zerkleinert worden waren.

### 2.2.6 Messung der RNA- und DNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte nach dem Prinzip der Absorptionsphotometrie im Gerät Nanodrop der Firma Thermo Fisher Scientific [118]. Bei dieser Methode werden 1,5 µl der Lösung mit Licht bestrahlt und die Intensität [I] des transmittierten Lichts gemessen [119].

RNA und DNA absorbieren Licht der Wellenlänge 260 nm. Auch das Medium, in dem die RNA oder DNA gelöst ist, absorbiert Licht dieser Wellenlänge. Daher muss zuerst ein Leerwert des Mediums ermittelt werden. Anschließend kann die durch Nukleinsäuren bedingte Absorption der Probe nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Absorption} = -\log(\text{Intensität}_{\text{Probe}} / \text{Intensität}_{\text{Leerwert}})$$

Um die Konzentration der RNA oder DNA berechnen zu können, muss die ermittelte Absorption in die aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz hergeleitete Formel  $c = (A \cdot e) / d$  eingesetzt werden [120]. Dabei entspricht [A] der Absorption, [e] dem für dieses Probenmaterial spezifischen Extinktionskoeffizienten und [d] der Schichtdicke der durchstrahlten Probe. Die Berechnung erfolgte vollautomatisch im Gerät, die Werte des Extinktionskoeffizienten betragen für gDNA 50 ng\*cm/µl, für cDNA 33 ng\*cm/µl und für RNA 40 ng\*cm/µl. Die Schichtdicke der durchstrahlten Probe betrug 1 mm und 0,2 mm, bei jeder Messung werden beide Schichtdicken nacheinander verwendet. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Verunreinigungen mit Proteinen oder Zuckern festzustellen, da Proteine bei 280 nm und Zucker bei 230 nm eine starke Absorption zeigen. Die Berechnung der Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  kann so Aufschluss über die Qualität der isolierten Nukleinsäure geben, wobei Werte über 1,8 für eine reine Nukleinsäuren-Lösung sprechen [121].



### 2.2.7 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Gentranskription kann durch die Menge der vorhandenen mRNA quantifiziert werden. Bei der quantitativen Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (s. Kap. 2.2.8) wird eine Polymerase verwendet, die nur DNA amplifizieren kann. Daher muss von der zuvor extrahierten mRNA ein DNA-Abbild erstellt werden. Durch das Enzym reverse Transkriptase ist es möglich, RNA in *complementary*-DNA (cDNA) umzuschreiben.

Es wurden, je nach extrahierter RNA-Menge, 100-500 ng RNA in cDNA umgeschrieben. 12 µl der zuvor entsprechend verdünnten RNA wurde 1 µl eines Oligo-dT-Primer zugegeben [122]. Dieser bindet durch zehnmünütige Inkubation bei 70 °C an den Poly-A-Schwanz, der am Ende jeder mRNA vorhanden ist [123]. Anschließend wurden dieser Lösung 12 µl des folgenden Ansatzes zugefügt:

M-MLV 5X <i>Reaction Buffer</i>	5 µl
RNAsin	1 µl
dNTPs	1,25 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl
a.d.	3,75 µl

**Tab. 2.2: RT-PCR Ansatz**

RNasin ist ein RNase-Inhibitor, der den Abbau von RNA verhindert.

Bei der *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) Reverse Transkriptase handelt es sich um eine modifizierte reverse Transkriptase, bei der die RNase-H-Aktivität deletiert wurde. Diese sorgt normalerweise dafür, dass die mRNA abgebaut wird, nachdem die cDNA synthetisiert wurde [124].

Die reverse Transkriptase wurde bei 42 °C für 60 min aktiviert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 10 min. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.8 Quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der quantitativen Bestimmung bestimmter Sequenzen von DNA. Sie findet vor allem Anwendung bei der Untersuchung von Genexpressionsstärken und bei Genotypisierungen [125].

Die qRT-PCR basiert auf einer Standard-PCR wobei während jedem Zyklus die vorhandene DNA-Menge quantifiziert wird. Ein im qRT-PCR-Ansatz enthaltener Stoff (z.B. Ethidiumbromid oder SYBR Green I) fluoresziert nur, wenn er in doppelsträngiger DNA interkaliert. Steigt die Menge der DNA steigt proportional die Fluoreszenz, welche am Ende des Elongationsschrittes gemessen wird. Je größer die Ausgangsmenge der mRNA und damit der cDNA war, desto früher kann die mit jedem Zyklus steigende DNA-Menge und damit Fluoreszenz detektiert werden. Somit kann die Expressionsstärke eines Genes quantifiziert werden [126].

Ein weiterer Unterschied der qRT-PCR zur gewöhnlichen PCR liegt darin, dass man eine Schmelzkurve und eine Standardkurve bestimmen kann. Die Schmelzkurve dient zur Verifizierung des PCR-Produktes. Am Ende der qRT-PCR wird die Temperatur langsam von 50 °C auf 95 °C erhöht. Jedes PCR-Produkt hat, abhängig von der Basensequenz und vom GC-Gehalt, eine spezifische Schmelztemperatur. Bei dieser denaturiert die DNA (die DNA-Stränge trennen sich voneinander). Da der vorhandene Marker nur in doppelsträngiger DNA fluoresziert, nimmt die Fluoreszenz ab. Bei der Schmelzkurve sollte idealerweise genau eine Temperatur vorhanden sein, an dem ein Fluoreszenzabfall zu sehen ist. Sind mehrere solche Temperaturen vorhanden, spricht dies für Primer, die unspezifische Produkte bilden, welche ein zusätzliches Fluoreszenzsignal abgeben. Solche Primer sind für die qRT-PCR nicht geeignet, da die gemessenen Werte nicht spezifisch für das zu untersuchende Produkt sind.

Die Standardkurve wird durch eine Verdünnungsreihe generiert. Sie dient zur Überprüfung der Primerfunktion sowie der Effizienz und ist Voraussetzung für die Quantifizierung. Dabei bedeutet eine Effizienz von 100%, dass sich die Menge des PCR-Produktes bei jedem Zyklus verdoppelt. Die Effizienz sollte bei einer guten Primerfunktion bei Werten über 80% liegen, ferner sollten die Punkte bei logarithmischer Darstellung auf einer Gerade liegen (p-Wert von 1). Hierbei sind Werte von 0,95 - 1 akzeptabel.

In dieser Arbeit diente die qRT-PCR zur Genexpressionsanalyse sowie zur Genotypisierung, sie wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt [127]:

EVA-Green	6 µl
Primer <i>forward/reverse</i>	je 0,5 µl
a.d.	3 µl

**Tab. 2.3: qRT-PCR Ansatz**

Die qRT-PCR wurde in einem Thermocycler (MX3000P) durchgeführt. Je nach Gen und somit Primerkombination variiert die Primeranlagerungstemperatur ( $T_{(\text{Annealing})}$ ). Des Weiteren besteht bei vielen Primern die Möglichkeit, die qRT-PCR als *2-step* durchzuführen, also auf den Elongationsschritt zu verzichten, um eine kürzere Laufzeit zu erreichen. Hierbei findet die Elongation zusätzlich zur Primeranlagerung im zweiten Schritt jedes Zyklus statt. Dies ist möglich, da die Genprodukte bei qRT-PCRs sehr kurz sind und die Polymerase somit nach der Primeranlagerung im selben Schritt noch ausreichend Zeit zur Amplifikation hat.

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte als *2-step* qRT-PCR unter folgenden Bedingungen:

Prädenaturierung bei 95 °C für 3 min anschließend 40 Zyklen mit

- (1) 10 s Denaturierung bei 95 °C
- (2) 30 s Primeranlagerung sowie Elongation bei 60 °C

Zuletzt erfolgte, ausgehend von 55 °C, alle 20 s die schrittweise Erhöhung der Temperatur in 0,5 °C-Schritten um die Schmelzkurve zu generieren.

Eine Ausnahme bildeten hierbei die Primer zur Bestimmung von P450scc und StAR. Beide wurden mit einem Elongationsschritt, also als *3-step* qRT-PCR durchgeführt. Der Elongationsschritt dauerte 15 s bei 72°C. Ebenso unterschied sich bei diesen Primerpaaren die  $T_{(\text{Annealing})}$  von den anderen Primerpaaren. Sie lag bei P450scc bei 53°C und bei StAR bei 63°C.

Die Quantifizierung der untersuchten Proben erfolgte durch den Vergleich mit einem Kalibrator, welcher eine Mischung aller untersuchten Proben ist. Die Berechnung geschah vollautomatisch durch die Software MxPro der Firma Stratagene [128]. Hierbei wurde die Expressionsstärke jeder Probe in Referenz zum Kalibrator ausgedrückt, sodass die Proben untereinander vergleichbar waren. Um einen Einfluss unterschiedlicher Mengen an cDNA auf die Expressionsstärke auszuschließen, wurde zur Normierung immer die Expression eines Referenzgens (*house keeping gene*) gemessen. Ein Referenzgen wird idealerweise nicht reguliert und kann damit als Maß dafür verwendet werden, wie viel cDNA sich in einer Probe befindet.

Die Berechnung der Expressionsstärke eines zu untersuchenden Gens wurde auf der Basis der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode durchgeführt [129]. Dabei wurde zunächst das Verhältnis von Probe zu Kalibrator gebildet. Dieselbe Berechnung wurde auch beim Referenzgen durchgeführt. Anschließend wurde der Quotient dieser Werte gebildet (untersuchtes Gen/Referenzgen) um die gemessene Expression auf den cDNA-Gehalt zu normieren. Nachdem von jeder Probe ein Referenzgen-normiertes, auf den Kalibrator bezogenes Expressionsniveau bestimmt worden war, konnten die verschiedenen Gruppen miteinander verglichen werden. Hierfür wurde aus den Expressions-Mittelwerten wiederum ein Quotient (z.B. transgene Gruppe/Kontrollgruppe)

gebildet. Um einen Einfluss der Primerfunktion auf die Expressionsanalyse zu verhindern, wurde bei der Berechnung jeweils noch die Effizienz der jeweiligen Primer, die mittels Standardkurve bestimmt worden war, einberechnet.

Alle Messungen der quantitativen Realtime-PCR erfolgten in Duplikaten.

### 2.2.9 Zellkultur

#### 2.2.9.1 Primärkultur aus Nebennieren

Die Nebennieren wurden aus dekapitierten Mäusen entnommen und unter einem Stereoskop mittels Dissektion von Fett befreit (s. Kapitel 2.2.1.2)

Die gereinigten Nebennieren wurden zusammen mit 300 µl Kollagenase in eine Petrischale gegeben und die Kollagenase zusätzlich mit einer Insulinspritze in die Nebennieren injiziert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Nebennieren mit einer Rasierklinge in sehr kleine Stücke zerschnitten und anschließend in eine 15ml Zentrifugenröhre überführt. 40 min nach der Kollagenase-Injektion wurde der Verdau durch Zugabe von fetalen Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette durch ein 70 µm-Zellsieb gedrückt und somit vereinzelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1100 rpm wurde dem Pellet ungefähr das 10-fache Volumen an Erythrozyten-Lysepuffer zugegeben, bei Raumtemperatur für 7 min inkubiert und anschließend wiederum für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von Primärzellkulturmedium wurden die Zellen gezählt und 100.000 Zellen pro Kavität in eine 24-Lochplatte ausgesät. Primärzellkulturmedium enthält *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)/F12 mit L-Glutamin und 15 mM HEPES + 10% FCS + 3,1 g/l Glucose + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) Die Hälfte der Zellen wurde für eine Stunde mit ACTH stimuliert, die andere Hälfte diente als Kontrollgruppe. Der Überstand wurde abgenommen und zur Messung der Corticosteronkonzentration verwendet. Aus den Zellen wurde RNA zur Genexpressionsmessung extrahiert.

#### 2.2.9.2 Mouse Embryonic Fibroblast (MEFs)

Zur Gewinnung von embryonalen Mausfibroblasten wurden Mäuse des passenden Genotyps verpaart. Jeden Morgen wurde durch Plug-Kontrolle überprüft, ob nachts eine Insemination stattgefunden hatte.

War dies der Fall, so wurden die Tage *post coitatem* (p.c.) gezählt, beginnend mit Tag 0,5 p.c. Am Tag 13,5 oder 14,5 p.c. wurde das Muttertier durch Isoflurannarkose und anschließenden Genickbruch getötet und die Embryonen entnommen. Jeder Embryo wurde einzeln in kaltem DMEM gewaschen, anschließend wurden Kopf, Pfoten, Schwanz und innere Organe entfernt

und für die Genotypisierung verwendet. Die Embryonen wurden in DMEM auf Eis gelagert, alle weiteren Arbeiten fanden unter einer Sterilbank statt [130].

Jedes Embryo wurde in Ethanol (70%) gewaschen und anschließend zusammen mit 8 ml MEF-Medium in eine 15 ml-Spritze, bei der der Kolben entfernt worden war, überführt. Anschließend wurden Embryo und Flüssigkeit durch eine 22 G-Kanüle gedrückt und mehrmals aufgezogen und abgeben. Derselbe Vorgang wurde mit einer 27 G-Kanüle wiederholt. Somit war es möglich, eine Lösung mit vielen einzelnen Zellen und sehr wenig Restgewebe zu erhalten.

MEF-Medium enthält neben einfachem *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) fetales Kälberserum (FCS), welches das Wachstum stimuliert und als Energielieferant dient, Penicillin /Streptomycin (P/S) als Antibiotika und die Aminosäure Glutamin [131].

DMEM	
FCS	10%
Penicillin / Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
Glutamin	1%

**Tab. 2.4: MEF-Medium**

Diese Zellsuspension wurde zusammen mit weiteren 6 ml MEF-Medium in eine gelatinebeschichtete Petrischale mit 10 cm Durchmesser überführt. Für die Beschichtung wurde Gelatine 1:10 in *phosphate buffered saline* (PBS) verdünnt und anschließend in das entsprechende Behältnis gebracht. Nach einer Einwirkungszeit von mindestens 30 min wurde der Überstand abgesaugt und die Schale zweimal mit PBS gewaschen.

Der Mediumwechsel mit 10 ml Medium erfolgte am folgenden Tag und dann an jedem zweiten Tag. Sobald eine Konfluenz von 80% erreicht war, wurden die Zellen vereinzelt. Dafür wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend mithilfe von Trypsin abgelöst. Durch Zugabe von MEF-Medium wurde das zellschädigende Trypsin deaktiviert und die Zellen konnten in eine Zentrifugenröhre überführt werden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand abgekippt, die Zellen in MEF-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 oder 1:4 in neue gelatinebeschichtete Petrischalen verteilt.

Ein Teil der Zellen wurde bei -80 °C in Einfriermedium (40% DMEM, 40% FCS, 20% *Dimethylsulfoxid* (DMSO)) eingefroren. Dabei wurde durch die Verwendung von Aufbewahrungsboxen, welche mit Isopropanol umgeben waren, ein langsames und kontinuierliches Abkühlen erreicht. Die restlichen Zellen wurden weiter vermehrt. Sobald eine ausreichende Zellzahl vorhanden war, wurde mit der Differenzierung begonnen.

### 2.2.9.3 Differenzierung von MEFs zu Adipozyten und anschließende Stimulation

Für die Differenzierung von MEFs zu Adipozyten wurden die Fibroblasten auf 6- und 12-Lochplatten, die mit 2,5 ml bzw. 1ml verdünnter Gelatine (1:10) beschichtet worden waren, ausgesät. Es wurden 200.000 (6-Lochplatte) bzw. 100.000 (12-Lochplatte) Zellen pro Kavität ausgesät. Die Mediummenge betrug bei allen Differenzierungsschritten 2,5 ml bzw. 1 ml Medium pro Kavität.

Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten (definiert als Tag -2) wurde ein Mediumwechsel mit MEF-Medium durchgeführt. Nach zwei Tagen (Tag 0) wurde ein Mediumwechsel mit MEF-Differenzierungsmedium durchgeführt.

IBMX in HBSS	1 $\mu$ M
Dexamethason 95% Ethanol	0,5 mM
Rosiglitazon in DMSO	10 $\mu$ g/ml
Insulin in 0,01 M HCl	1 $\mu$ M
bFGF in 0,1% BSA in PBS	20 ng/ml

**Tab. 2.5: Zusätze in MEF-Differenzierungsmedium**

An Tag 3 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. An den Tagen 5, 7 und 9 wurde ein Mediumwechsel mit MEF-Medium, welches zusätzlich 10  $\mu$ g/ml Insulin, 20 ng/ml *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und 1  $\mu$ M Rosiglitazon enthielt, durchgeführt. Ein weiterer Mediumwechsel mit normalem MEF-Medium erfolgte an Tag 10. Die Adipozyten-Differenzierung war an Tag 12 beendet, daraufhin konnten die Zellen mit ACTH bzw. Noradrenalin stimuliert werden.

Nach der Stimulation wurde aus einem Teil der Zellen RNA extrahiert. Bei den übrigen Zellen wurde die Lipolyse durch Messung des Glycerols im Überstand untersucht und anschließend auf die Proteinmenge (und damit auf die Zellzahl) normiert. Für diese beiden Zwecke wurde nach verschiedenen Schemata vorgegangen.

Stimulation für RNA-Extraktion: Die Stimulation erfolgte über eine Dauer von sechs oder 48 Stunden mit ACTH ( $10^{-7}$  M). Dieses wurde in normalem MEF-Medium gelöst. Nach durchgeführter Stimulation wurden pro Kavität 200-300  $\mu$ l *Lysis Buffer* des RNA-Extraktionskits zugegeben, anschließend erfolgte die RNA-Extraktion wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben.

Stimulation für Lipolyse-Messung: Es wurde mit zwei verschiedenen ACTH-Konzentrationen ( $10^{-8}$  M und  $10^{-7}$  M) sowie mit Noradrenalin ( $10^{-6}$  M) stimuliert. Die genannten Substanzen wurden in MEF-Medium verdünnt, welchem 2% Bovines Serum Albumin (BSA) zugesetzt worden war. Die Kontrollgruppe wurde mit MEF-Medium behandelt, welches ebenfalls 2% BSA enthielt. Nach zweistündiger Stimulation wurde der Überstand abgenommen. Der Überstand sowie die zugehörigen Platten wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Platten wurden benötigt, um durch eine Messung der Proteinkonzentration eine Normierung der Lipolyse-Messung auf die Proteinmenge vornehmen zu können.

### 2.2.10 Lipolyse-Messung

Zur Quantifizierung der Lipolyse wurde die Glycerol-Konzentration im Überstand der stimulierten Zellen bzw. der Kontrollgruppe gemessen. Die Messung erfolgte in einer 96-Loch Mikrotiterplatte, die anschließende Berechnung basierte auf einer Standard-Lösung der Firma Sigma.

Pro Kavität wurden 25  $\mu\text{l}$  der Probe bzw. des Standards verwendet, anschließend 200  $\mu\text{l}$  des *Free Glycerol Reagent* (Fa. Sigma) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch mehrere enzymatische Reaktionen kam es proportional zur enthaltenen Glycerol-Menge zu einer Farbentwicklung. Die Absorption wurde anschließend bei 540 nm photometrisch gemessen [132].

Die Glycerol-Konzentrationen der Proben wurden mithilfe einer Standardkurve, die anhand der Absorptionsmessung bekannter Glycerol-Konzentrationen berechnet worden war, bestimmt. Alle Messungen erfolgten in Duplikaten.

### 2.2.11 Proteinkonzentrationsmessung

Um die gemessene Glycerol-Konzentration auf die Zellzahl der jeweiligen Probe zu normieren, wurde zusätzlich die in der Probe vorhandene Proteinmenge als Maß für die vorhandene Zellzahl bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden die Platten zunächst mit PBS gewaschen und anschließend 100  $\mu\text{l}$  *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA-Puffer) pro Kavität zugegeben. Nach 15-minütigem Rütteln wurde die Lösung abgenommen und für 15 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 13.000 rpm zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen. Nach einer 1:10 Verdünnung wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte aufgebracht und 40  $\mu\text{l}$  eines Reaktionsreagenz zugegeben. Das Reaktionsreagenz wurde durch eine Mischung der Roti-Quant universal Reagenzien 1 und 2 (Mischverhältnis 4:1) hergestellt. Nach 30-minütiger

Inkubation bei 37 °C konnte die Absorption, die direkt proportional zur enthaltenen Proteinkonzentration war, bei 503 nm gemessen werden [133].

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve. Zu deren Berechnung wurde zusätzlich die Absorption von bekannten Proteinkonzentrationen (2 mg, 1,5 mg, 1 mg, 0,5 mg, 0,25 mg, 0,125 mg, 0,0625 mg) gemessen.

Alle Arbeiten für die Proteinkonzentrationsmessung erfolgten auf Eis, alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

### 2.2.12 Paraffineinbettung von Gewebe

Entnommenes Gewebe wurde bis zur Einbettung in 30% Ethanol (Nebennieren, Fettgewebe) bzw. Bouin'scher Lösung (Gonaden) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Einbettung erfolgte automatisiert in einem Einbettautomaten, Typ STP 120 (Fa. Thermo Fisher Scientific). Die Gewebe befanden sich dabei in Einbettkassetten und es wurde folgendes Protokoll zur Paraffinisierung angewendet:

- |                 |       |
|-----------------|-------|
| 1. Ethanol 30%  | 2x2 h |
| 2. Ethanol 70%  | 2x2 h |
| 3. Ethanol 95%  | 2x2 h |
| 4. Ethanol 100% | 2x2 h |
| 5. Xylol        | 2x2 h |
| 6. Paraffin     | 2x2 h |

Anschließend wurden die eingebetteten Gewebe in Paraffinblöcke gegossen, was mithilfe einer Paraffin-Ausgießstation durchgeführt wurde. Die Paraffinblöcke wurden gekühlt und in ein Mikrotom eingespannt, mit welchem 4-5 µm dicke Schnitte der Gewebe angefertigt werden konnten. Diese wurden in einem Wasserbad befeuchtet, anschließend auf Objektträger aufgebracht und getrocknet. Nachdem die Schnitte innerhalb von ca. 24 h vollständig getrocknet waren, konnten sie nach der Hämatoxylin-Eosin Methode gefärbt werden.

### 2.2.13 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung können feingewebliche Schnitte unterschiedlicher Gewebe im mikroskopischen Bild angefärbt werden. Hämatoxylin färbt basophile (saure) Strukturen blau an. Hierzu zählen vor allem Zellkerne und die darin enthaltene DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum durch die daran gebundenen Ribosomen. Eosin färbt azidophile (basische) Strukturen rot an, dies sind im vor allem Zellplasmae Proteine [134]. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:



## Material und Methoden

---

1. Xylol	2x3 min
2. Ethanol 100%	2x3 min
3. Ethanol 95%	2x3 min
4. MilliQ ddH <sub>2</sub> O	2x3 min
5. Hämatoxylin	5 s
6. MilliQ ddH <sub>2</sub> O	waschen
7. Eosin	10 s
8. Ethanol 95%	30 s
9. Ethanol 100%	30 s
10. Xylol	30 s

Die Substanzen befanden sich dabei in einem Färbekasten. Die Objektträger waren in ein Färbegestell eingelegt, in dem sie von einem Färbekasten in den nächsten überführt werden konnten.

Sofort nach der Färbung wurden die Schnitte durch *Richard Allan Scientific Mounting Medium* unter einem Deckglas fixiert.

### 2.2.14 Analyse von gefärbten Paraffinschnitten des subcutanen Fettgewebes

Das gefärbte subcutane Fettgewebe wurde hinsichtlich der Größe der einzelnen Fetttröpfchen analysiert, wobei pro Tier zwei Schnitte untersucht wurden. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte zunächst bei einer 40-fachen Vergrößerung mit einer Kamera der Firma Leica fotografiert. Die Vermessung der Fetttröpfchen erfolgte mit dem Programm ImageJ des *National Institute of Health*.

Die gemessenen Größen wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen und der Durchschnitt der Größen gebildet.

### 2.2.15 Corticosteron-Messung

Die Konzentrationsmessung von Corticosteron wurde mittels kompetitiven enzymgekoppelten Immunabsorptionstests (EIA) durchgeführt. Dafür wurde ein vorgefertigter Assay der Firma IDS verwendet [135]. Es wurden Überstände von ACTH-stimulierten Zellen und Blut von dekapitierten Mäusen untersucht. Im Vorfeld der Dekapitation mussten die Mäuse mindestens einen Tag lang in jeweils einen separaten Käfig gesetzt werden. So wurde verhindert, dass aus einem Käfig mit mehreren Mäusen das entsprechende Tier herausgesucht werden musste. Dies

ist wichtig, um die Zeit bis zum Anfang der Narkose möglichst kurz zu halten. Dadurch werden stressbedingt erhöhte Corticosteronwerte vermieden.

Die 96-Loch Mikrotiterplatte, auf der die Messung durchgeführt wurde, war mit einem spezifischen Antikörper für Corticosteron beschichtet. Durch Zugabe von Probe bzw. Standard kam es zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes. Anschließend wurde ein enzymgebundenes Antigen, welches ebenfalls an den auf der Platte befindlichen Antikörper bindet, zugegeben und für 4 h inkubiert. Das enzymgekoppelte Antigen konkurriert mit dem freien Antigen (Probe bzw. Standard) um die Bindung am spezifischen Antikörper. Durch einen Waschschrift wurde nicht gebundenes Antigen entfernt. Anschließend wurde eine Lösung, welche Tetramethylbenzol und Wasserstoffperoxid als Substrat enthielt, zugegeben. Das an das Antigen gekoppelte Enzym setzte das Tetramethylbenzol in ein Reaktionsprodukt um, was zu einer Farbentwicklung führte. Diese Reaktion wurde nach 30 min durch die Zugabe von 0,5 M Salzsäure (HCl) gestoppt. Je mehr freies Antigen vorhanden war, desto weniger enzymgekoppeltes Antigen konnte binden und desto geringer war demnach die entstandene Farbentwicklung. Die Farbentwicklung war daher indirekt proportional zur Corticosteronkonzentration und wurde in einem Mikroplatten-Lesegerät photometrisch gemessen. Die Corticosteronkonzentration konnte anhand einer angefertigten Standardkurve berechnet werden, was vollautomatisch durch das Mikroplatten-Lesegerät geschah. Die Standardkurve wurde anhand von Standards mit bekannten Konzentrationen berechnet indem deren Absorption ebenfalls gemessen wurde. Ein Standard, der auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt wurde, war im verwendeten Kit enthalten. Bei der Berechnung war zu beachten, dass die ACTH-stimulierten Proben 1:90 und die Kontrollproben 1:30 verdünnt worden waren. Die Bestimmung erfolgte jeweils in Duplikaten.

Im Falle der Konzentrationsbestimmung bei Primärkulturzellen sollte verhindert werden, dass Unterschiede der Corticosteronkonzentration lediglich durch eine abweichende Zellzahl der einzelnen Proben verursacht wurde. Deshalb wurde die Corticosteronkonzentration auf die Menge der extrahierten RNA normiert, welche als Maß für die Zellzahl angenommen wurde.

### 2.2.16 ACTH-Messung

Die Messung der ACTH-Konzentration wurde mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Hierfür wurde ein Kit der Firma Biomerica verwendet [136]. Als Probenmaterial diente dasselbe Plasma, das zur Analyse der Corticosteronkonzentrationen verwendet wurde.

Zu Beginn wurden jeweils Plasma, Kalibratoren oder Kontrollen zusammen mit zwei verschiedenen ACTH-Antikörpern in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte inkubiert. Einer dieser Antikörper war biotinyliert. Da die Biotin-Streptavidin-Bindung eine der stärksten nichtkovalenten biologischen Bindungen ist, haftet der biotinylierte Antikörper fest in der Vertiefung. Durch seine ACTH-Bindungsstelle bindet er freies ACTH, welches somit in der Vertiefung fixiert wird [137]. An einer anderen Stelle des ACTH-Moleküls bindet der zweite Antikörper. Dieser ist an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welches die spätere Farbreaktion katalysiert. Nach vierstündiger Inkubation wurde die Platte mehrmals gewaschen, wodurch lediglich ACTH-gebundene Antikörper zurück blieben, die fest am Plattenboden hafteten. Anschließend wurde Tetramethylbenzidin zugegeben. Dieses bildet durch Reaktion mit der Antikörper-gebundenen Meerrettich-Peroxidase ein blaues Substrat. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stopplösung, welche Schwefelsäure enthält, beendet. Der Farbumschlag konnte bei 450 nm, was in diesem Fall der Wellenlänge mit der maximalen Absorption entspricht, photometrisch gemessen werden. Zusätzlich wurde die Absorption noch einmal bei 405 nm gemessen. Da bei dieser Wellenlänge die Absorption geringer ist, können auch höhere ACTH-Konzentrationen bestimmt werden. Bei beiden Messungen war die ACTH-Konzentration direkt proportional zur gemessenen Farbintensität. Die Farbintensitäten der mitgelieferten Kalibratoren, deren ACTH-Konzentrationen bekannt waren, wurden ebenfalls gemessen und anhand dieser Werte eine Standardkurve erstellt. Mithilfe der Standardkurve konnten dann die Konzentrationen der Proben bestimmt werden. Es wurden jeweils Duplikate bestimmt.

### 2.2.17 Verarbeitung der Rohdaten

Die Verarbeitung der Rohdaten wurde im Tabellenkalkulationsprogramm Office Excel (Versionen 2003 und 2007) der Firma Microsoft durchgeführt. Zur Überprüfung, ob Unterschiede in den Ergebnissen zwischen jeweils zwei Gruppen signifikant waren, wurde der Zweistichproben-T-Test verwendet. Dabei wurden Unterschiede, die einen p-Wert von  $< 0,05$  erreichten, als statistisch signifikant angesehen und in drei Signifikanzniveaus ( $< 0,05$ ;  $< 0,01$ ;  $< 0,001$ ) eingeteilt. Waren mehr als zwei Gruppen vorhanden, so wurden jeweils zwei Gruppen miteinander verglichen und somit verschiedene Vergleichswerte generiert. Die gezeigten Balkendiagramme wurden ebenfalls mit Excel erstellt und bearbeitet.

### 3 Ergebnisse

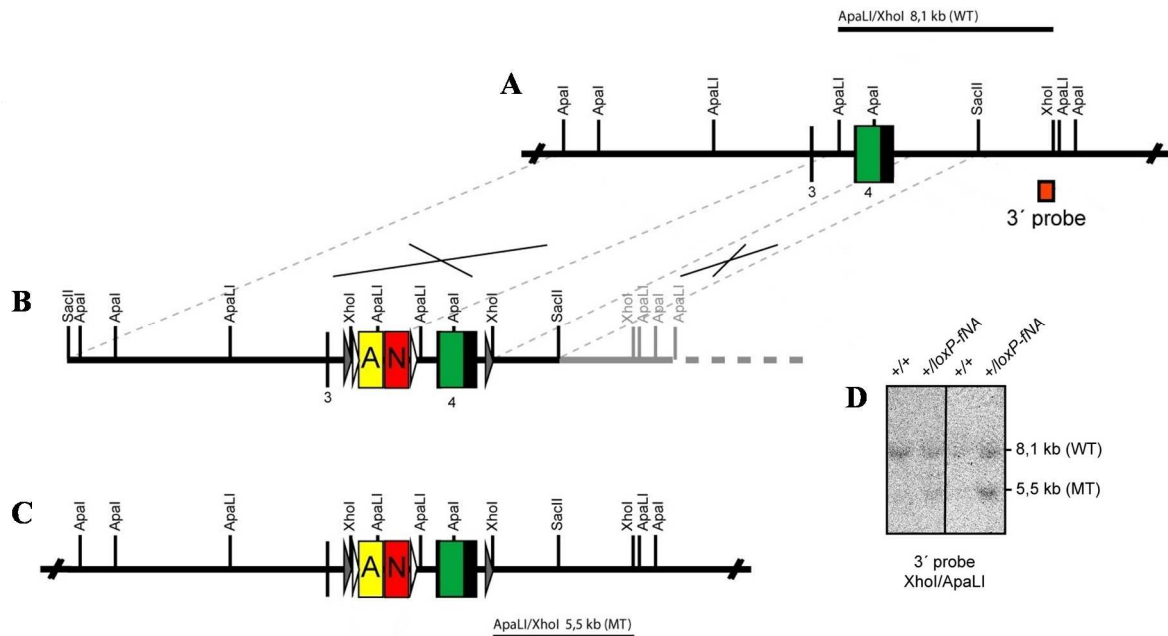
#### 3.1 Analyse und Zucht der transgenen Mäuse

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit hatte die Arbeitsgruppe von Dr. Jan Deussing am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München eine Mauslinie generiert, bei welcher auf einem Allel (heterozygot) anstatt des normalen MC2-R ein von loxP-sites umgebener MC2-R vorhanden sein sollte. Der hierfür erforderliche *targeting vector* (TV) war in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Beuschlein zuvor kloniert worden (Dr. M. Betz, B. Mauracher, Dr. M. Slawik). Das langfristige Ziel war es zunächst, Mäuse zu züchten, die auf beiden Allelen ihres Genoms den loxP-flankierten MC2-R aufweisen (also homozygot für diese Mutation sind) und zusätzlich eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (CreERT2) besitzen. Diese Mauslinie sollte also einen Tamoxifen-induzierbaren *knock-out* des MC2-R aufweisen. Ein exemplarisches Kreuzungsschema für die Generierung einer solchen Mauslinie findet sich in Kapitel 1.5.5 bzw. Abb. 1.6. Sobald eine ausreichende Zahl der gewünschten Mäuse vorhanden war, sollten weiterführende Experimente zur Funktion des MC2-R im Fettstoffwechsel durchgeführt werden.

Der TV, auf dem der modifizierte MC2-R vorhanden war, wurde wie in Kap. 1.5.4 beschrieben in Mausstammzellen eingebracht. Hier sollte er durch homologe Rekombination ins Genom integrieren und somit den ursprünglich vorhandenen MC2-R ersetzen. Um überprüfen zu können, ob der TV nach dem Einbringen wirklich im Genom vorhanden war, war dieser mit einer Ampicillin/Neomycin-Resistenzkassette ausgestattet. Durch die Behandlung aller Stammzellen mit diesen Substanzen konnten diejenigen selektioniert werden, in welchen der TV vorhanden war, da diese Zellen durch die Resistenzkassette unempfindlich gegen die normalerweise toxischen Stoffe geworden waren. Im Rahmen der homologen Rekombination kann es vorkommen, dass der TV an einer falschen Stelle eingebaut wird. Daher sollten in einem zweiten Selektionsschritt solche Stammzellen gefunden werden, bei welchen der TV an der richtigen Stelle ins Genom integriert und somit auf einem Allel den ursprünglich vorhandenen MC2-R ersetzt hatte. Für diesen Zweck wurden die Stammzellen per Southern-Blot-Analyse untersucht.

Bei diesem Verfahren wird die DNA zunächst durch Restriktionsenzyme an den für diese Enzyme spezifischen Stellen geschnitten. Anschließend wird die DNA per Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Spaltung der DNA in Einzelstränge werden die Banden auf eine Membran übertragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde, die komplementär zur gesuchten Sequenz ist, angefärbt. Je nach vorhandenen Schnittstellen ergeben sich Fragmente unterschiedlicher Größe. In diesem Fall wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen ApaLI

sowie XhoI verdaut. Im eingebrachten TV war im Vergleich zum nativen Genom eine zusätzliche XhoI-Schnittstelle vorhanden, wodurch das Fragment hier kürzer war. Die Restriktionsenzymchnittstellen sowie die Southern-Blot-Analyse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 3.1: Schnittstellen der Restriktionsenzyme sowie Southern-Blot-Analyse**

**A:** Wildtyp-DNA-Sequenz mit Darstellung des WT-Fragments

**B:** homologe Rekombination (schwarze Bereiche werden ersetzt, graue verbleiben)

**C:** Zustand nach homologer Rekombination

Das Restriktionsenzym XhoI besitzt im Vergleich zur Original-Sequenz im TV eine zusätzliche Schnittstelle (**C**), daher ist das Fragment hier mit 5,5kb kürzer als bei der WT-Sequenz (8,1kb) (**A**).

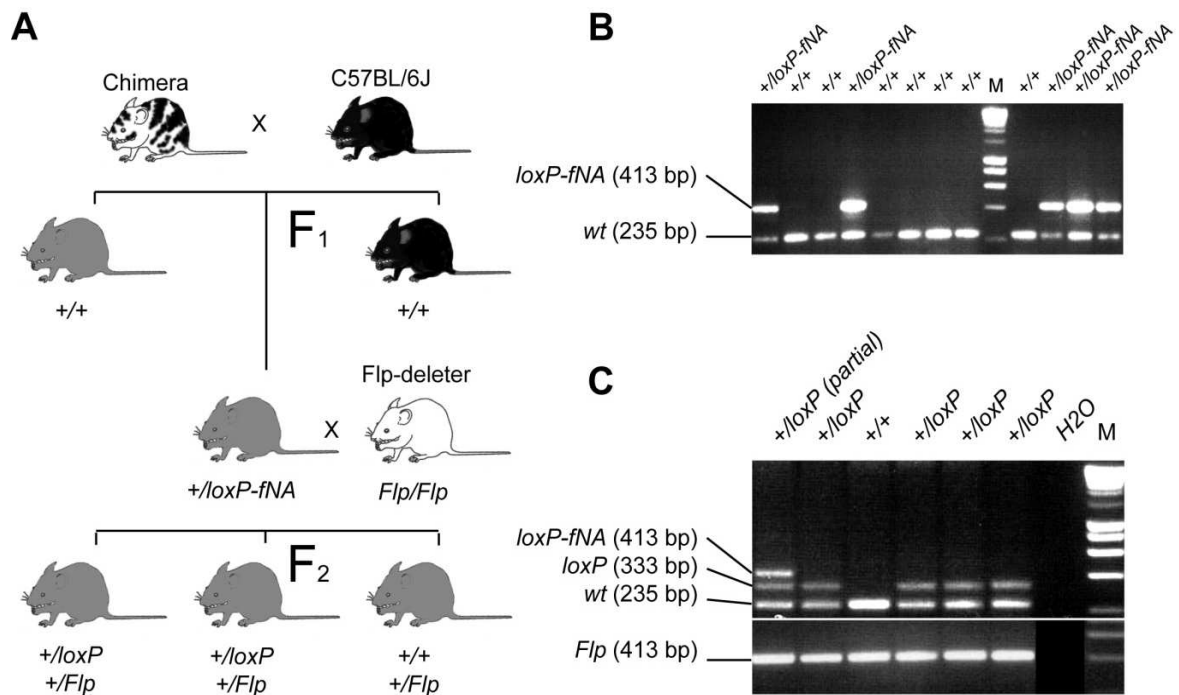
**D:** Southern-Blot Analyse eines Wildtyp-Klons (+/+) mit der WT-Bande sowie eines Klons, bei welchem der TV vorhanden ist (+/loxP-fNA) und bei der sich deshalb sowohl die WT als auch die MT-Bande (M=Mutant) zeigen.

►: loxP-site; ▽: frt-site; **AN:** Ampicillin/Neomycin-Resistenzkassette

Nachdem erfolgreich transfizierte embryonale Stammzellen selektioniert worden waren, wurden diese wie in Kap. 1.5.3 beschrieben durch Blastozysten-Injektion in Muttertiere überführt und von diesen ausgetragen. Die so entstanden Chimären mit Genotyp +/loxP-fNA wurden mit Wildtyp-C57BL/J6-Tieren verpaart, sodass in der ersten Tochtergeneration (F<sub>1</sub>) 25% der Nachkommen ebenfalls den Genotyp +/loxP-fNA aufwiesen. +/loxP-fNA Tiere enthielten neben dem MC2-R-Wildtypallel ein Allel, bei dem der MC2-R von loxP-sites

umgeben war. Zusätzlich war hier eine Neomycin/Ampicillin-Resistenzkassette vorhanden. Die Tiere dieser Generation wurden mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht, wobei für Wildtyp- und +/loxP-fNA-Tiere zwei verschiedene Primerpaare verwendet wurden. Der +/loxP-fNA-Genotyp wurde mithilfe der Primer fGT1+2 nachgewiesen. Dieses Primerpaar konnte im Wildtyp kein Produkt bilden, da die Bindungsstelle des fGT2-Primers in der Neomycin/Ampicillin-Resistenzkassette lag, welche in Wildtyp-Tieren nicht vorhanden ist. Der Wildtyp wurde durch die Primer fGT1+4 nachgewiesen, welche wiederum bei Anwesenheit des TV kein Produkt bildeten, da dieses wegen der großen Länge (ca. 3000 bp) nicht amplifiziert werden kann. Bei heterozygoten +/loxP-fNA Tieren fanden sich zwei Banden, da sowohl Wildtyp- als auch TV-Allel vorhanden waren. Bei Wildtyp-Tieren zeigte sich hingegen nur die Wildtyp-Bande.

Die +/loxP-fNA-Mäuse trugen neben den loxP-sites noch Bindungsstellen für eine andere Rekombinase, die *frt-sites* (s. Kap 1.5.4). Diese Bindungsstellen werden durch die Flp-Rekombinase erkannt, welche den dazwischenliegenden Genombereich inklusive einer *frt-site* entfernt und die DNA anschließend wieder neu verknüpft. Die andere *frt-site* verbleibt im Genom. In diesem Fall war die Neomycin/Ampicillinkassette von *frt-sites* umgeben (fNA) und sollte durch die Flp-Rekombinase entfernt werden, um mögliche störende Einflüsse der Resistenzkassette auf die weiteren Experimenten zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden +/loxP-fNA-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, welche homozygot eine Flp-Rekombinase trugen (Flp-Deleter). Bei Nachkommen der nächsten Generation (F<sub>2</sub>), die sowohl die Flp-Rekombinase als auch den TV im Genom trugen, konnte die konstitutiv aktive Flp-Rekombinase die *frt-sites* im TV erkennen und somit die *frt*-flankierte Neomycin/Ampicillin-Resistenzkassette entfernen. Die so entstandenen Mäuse wiesen den Genotyp +/loxP auf (fNA entfernt). Die Deletion der Resistenzkassette kann man auch anhand der durchgeführten PCR erkennen. Es wurden dieselben Primerpaare (fGT1+2 und fGT 1+4) verwendet wie in der F<sub>1</sub>-Generation. Da der fGT2-Primer in der Resistenzkassette bindet, ergab sich bei +/loxP Tieren kein Produkt mehr. Die Unterscheidung zwischen +/loxP- und Wildtyp-Tieren gelang durch Vergleich der Bandenlänge. Die +/loxP-Bande ist durch das Vorliegen der loxP- und der verbliebenen *frt-site* um 98 Basen länger als die Wildtyp-Bande. Das Kreuzungsschema mit PCR-Genotypisierung (Abb. 3.2) sowie eine genaue Beschreibung der Primerbindungsstellen (Abb. 3.3) zeigen die nächsten beiden Abbildungen.



**Abb. 3.2: Kreuzungsschema um heterozygote +/loxP-Mäuse zu erhalten und Genotypisierung der Tiere mittels PCR und Gelelektrophorese**

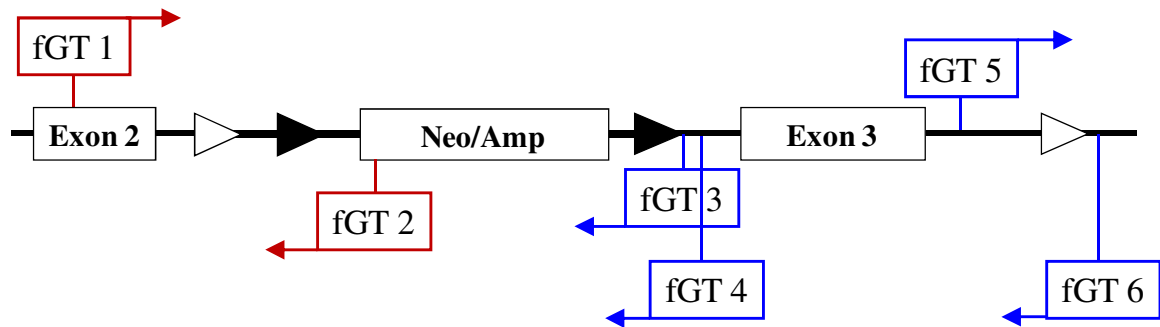
A) Chimären mit Genotyp +/loxP-fNA wurden mit C57BL/6J-Tieren verpaart. Die Nachkommen wiesen entweder den Wildtyp-Genotyp (+/+) oder den Genotyp +/loxP-fNA auf, was mittels PCR überprüft wurde (B).

Heterozygote F<sub>1</sub>-Tiere wurden mit Flp-Deleter-Mäusen verpaart um die Neomycin/Ampicillin-Kassette zu entfernen. Die Nachkommen dieser Kreuzung (F<sub>2</sub>) wurden ebenfalls mittels PCR analysiert (C). Wildtyp- und +/loxP-Tiere konnten anhand der Bandenlänge (235 bp vs. 333 bp) unterschieden werden. Die Entfernung der Resistenzkassette zeigte sich in der Anwesenheit einer 333 bp langen loxP-Bande (+/loxP) anstatt der 413 bp langen loxP-fNA-Bande (+/loxP-fNA). Die Flp-Rekombinase war in allen Tieren der F<sub>2</sub>-Generation vorhanden und konnte ebenfalls mittels PCR nachgewiesen werden.

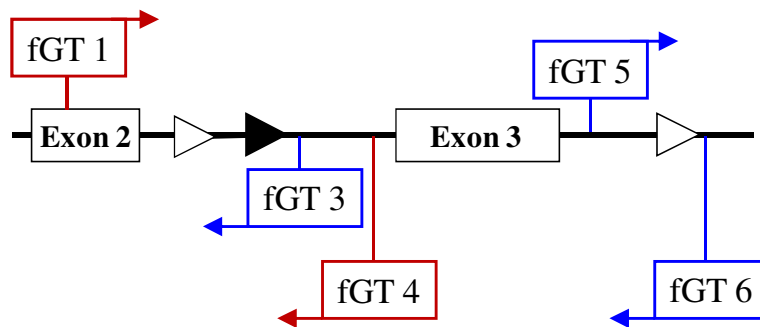
**+/+**: Wildtyp-Tier; **+/loxP-fNA**: Tier mit TV inklusive Resistenzkassette auf einem Allel und Wildtyp-Situation auf dem anderen; **+/loxP**: Tier mit TV ohne Resistenzkassette auf einem Allel und Wildtyp-Situation auf dem anderen;

**M**: DNA-Marker; **H<sub>2</sub>O**: Negativkontrolle

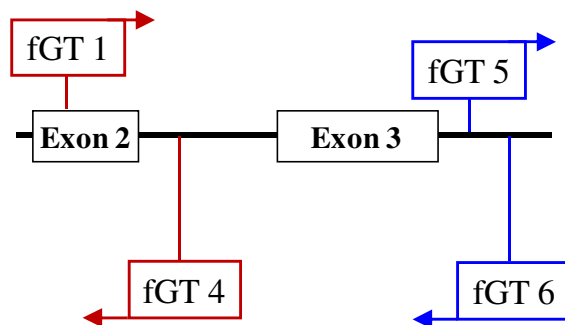
**A) TV vor Kreuzung mit Flp-Deleter-Maus**



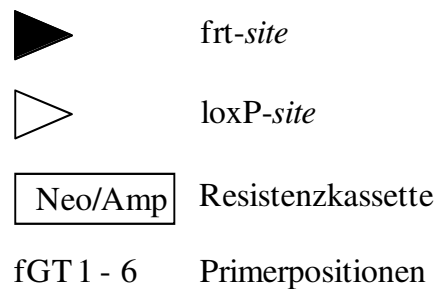
**B) TV nach Kreuzung mit Flp-Deleter-Maus**



**C) Wildtyp-Maus**



**D) Legende**



**Abb. 3.3: Primerpositionen im TV bei verschiedenen Kreuzungsschritten sowie bei Wildtyp-Tieren**

War im TV noch die Neomycin/Ampicillin-Resistenzkassette vorhanden (**A**), so konnte diese mit den Primern fGT 1+2 nachgewiesen werden (Produktlänge 413 bp).

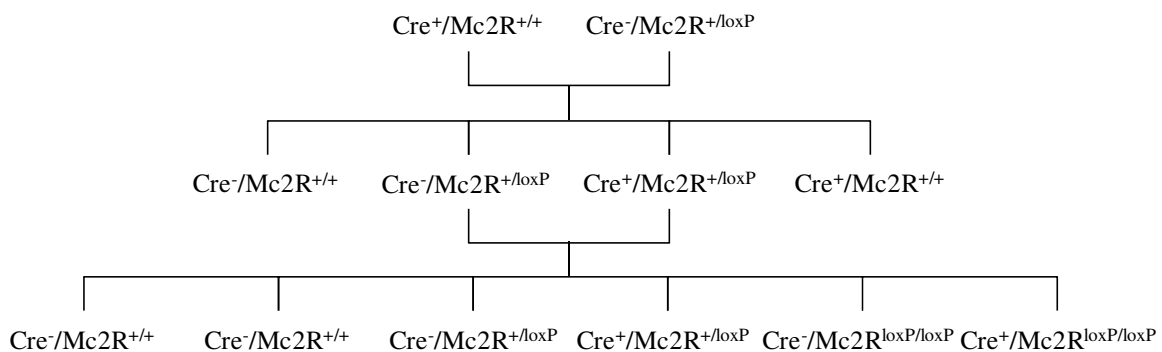
Wurde die Resistenzkassette entfernt (**B**), konnte dies durch ein PCR-Produkt von 333 bp Länge nachgewiesen werden, welches durch die Primer fGT 1+4 amplifiziert wurde. Diese bildeten nur ein Produkt, wenn die Resistenzkassette nicht mehr vorhanden war, ansonsten war das Produkt für eine Amplifikation zu lang.

Dasselbe Primerpaar (fGT 1+4) bildete bei einer Wildtypmaus (**C**) ein kürzeres Produkt von 235 bp Länge, da hier die loxP- und frt-Sequenz nicht vorhanden waren.



Drei Männchen mit dem Genotyp  $+/\text{loxP}$  und zusätzlicher Flp-Rekombinase wurden der Arbeitsgruppe Beuschlein durch das Max-Planck-Institut zur Verfügung gestellt. Alle im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit generiert.

Neben den beschriebenen  $\text{MC2-R}^{+/\text{loxP}}$ -Mäusen standen  $\text{R26-Cre-ERT2}^+$ -Tiere zur Verfügung. Diese trugen eine induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Rosa26-Promotors (R26). Für diesen Promotor wurde gezeigt, dass er in Mäusen ubiquitär exprimiert wird [138]. ERT2 steht für *Estrogen Rezeptor T2*, der selektiv Tamoxifen bindet. Ziel war es, durch mehrere Kreuzungsschritte Mäuse mit Genotyp  $\text{MC2-R}^{\text{loxP/loxP}};\text{R26-Cre-ERT2}^+$  (im Folgenden  $\text{Cre}^+$  genannt) zu züchten. Bei diesen Mäusen wäre also zum einen der MC2-R auf beiden Allelen von *loxP-sites* umgeben und andererseits würden diese Tiere eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase tragen. So hätte der MC2-R Tamoxifen-induziert entfernt werden können. Ein beispielhafter Kreuzungsplan ist in Abb. 3.4 dargestellt.



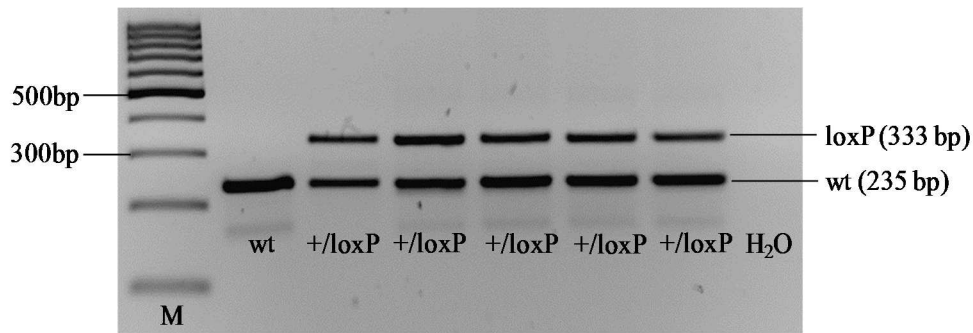
**Abb. 3.4: Vereinfachtes Kreuzungsschema um  $\text{Cre}^+/\text{MC2-R}^{\text{loxP/loxP}}$ -Mäuse zu generieren**

**$\text{Cre}^+$** : transgene Cre-Rekombinase;  **$\text{Cre}^-$** : keine Cre-Rekombinase (Wildtyp)

**$\text{Mc2R}^{+/+}$** : Wildtyp-MC2-R;  **$\text{Mc2R}^{+/lox}$** : MC2-R heterozygot von *loxP-sites* flankiert;

**$\text{Mc2R}^{\text{lox/lox}}$** : MC2-R homozygot von *loxP-sites* flankiert

Zunächst wurden die  $\text{MC2-R}^{+/\text{loxP}}$ -Männchen mit Wildtyp-Weibchen verpaart, um die Zahl an  $\text{MC2-R}^{+/\text{loxP}}$ -Tieren zu vergrößern. Die Nachkommen wurden auf ihren MC2R-Genotyp untersucht. Dazu wurde DNA, welche aus Schwanzbiospien extrahiert worden war, mittels o.g. Primern (fGT1+4) analysiert. Tiere mit Genotyp  $\text{MC2-R}^{+/\text{loxP}}$  wiesen zwei Banden auf: die Wildtyp- und die *loxP*-Bande. Wildtyp-Tiere zeigten dementsprechend nur die Wildtyp-Bande (s. Abb. 3.5).

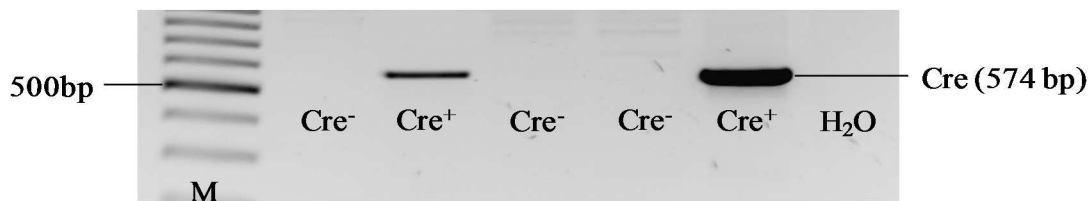


**Abb. 3.5: Gelelektrophorese zur loxP-Genotypisierung**

**wt:** Wildtyp (nur Wildtyp-Bande); **+/loxP:** MC2-R<sup>+/loxP</sup> (loxP- und Wildtyp-Bande);

**M:** DNA-Marker; **H<sub>2</sub>O:** Negativkontrolle

Neben der Kreuzung von MC2-R<sup>+/loxP</sup> mit Wildtyp-Tieren wurden parallel Cre<sup>+</sup>-Tiere mit MC2-R<sup>+/loxP</sup>-Tieren verpaart. Bei Nachkommen dieser Tiere wurde einerseits der MC2-R-Genotyp überprüft, andererseits wurde ebenfalls mittels PCR festgestellt, ob die Jungtiere die Cre-Rekombinase trugen. Im Falle einer vorhandenen Cre-Rekombinase zeigte sich eine Bande von 574 bp Länge, bei Wildtyp-Tieren war keine Bande vorhanden (s. Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Gelelektrophorese zum Nachweis der Cre-Rekombinase**

Die unterschiedliche Bandenstärke beruht auf unterschiedlichen Mengen der eingesetzten DNA. Da nur die Anwesenheit der Cre-Rekombinase nachgewiesen werden sollte, war die Bandenstärke nicht relevant, weshalb die DNA-Mengen nicht normiert wurden.

**Cre<sup>-</sup>:** keine Cre-Rekombinase; **Cre<sup>+</sup>:** Cre-Transgen; **M:** DNA-Marker; **H<sub>2</sub>O:**

Negativkontrolle

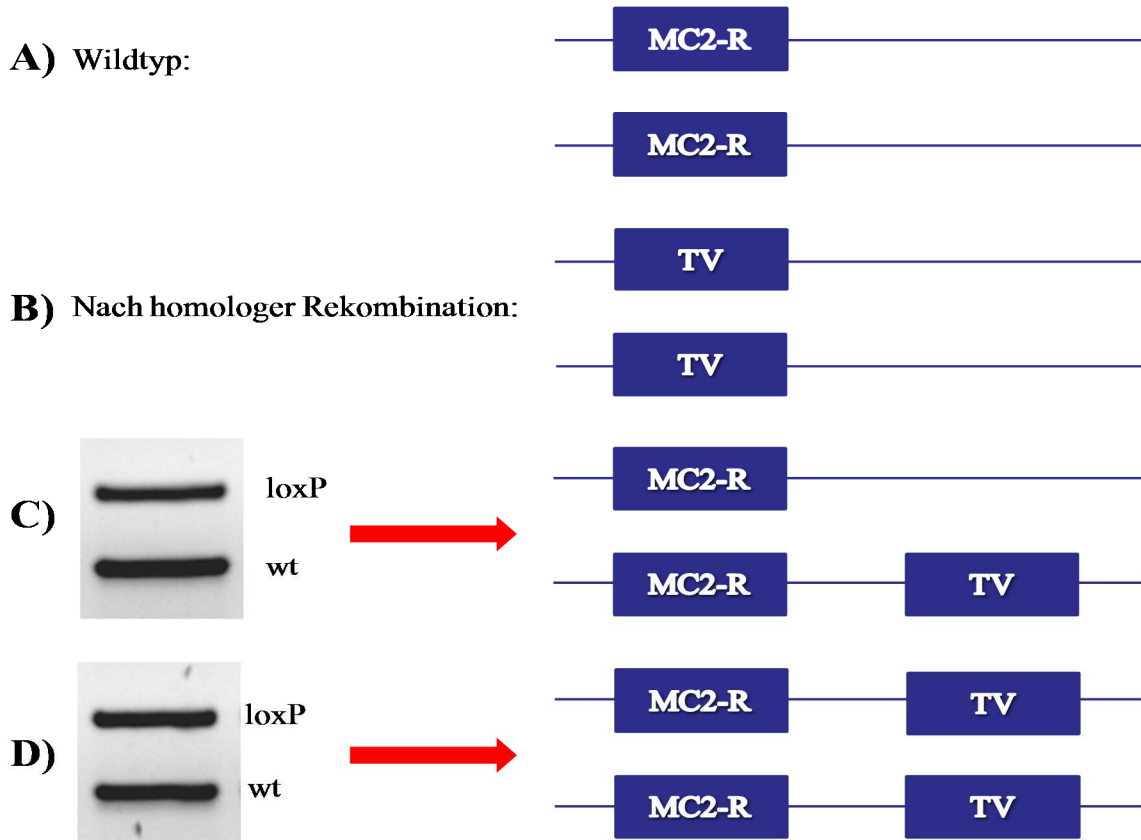
Die drei vom Max-Planck-Institut erhaltenen MC2-R<sup>+/loxP</sup>-Männchen trugen wegen oben beschriebener Kreuzung mit einer Flp-Deleter-Maus zwar keine Resistenzkassette mehr, die Flp-Rekombinase war aber heterozygot vorhanden. Um mögliche Nebeneffekte der Flp auf geplante Experimente auszuschließen, wurden Nachkommen ohne Flp-Rekombinase selektioniert. Dazu wurde eine PCR mit den Primern Flp *forward&reverse* durchgeführt. War die Flp-Rekombinase vorhanden wurde diese durch eine 413 bp lange Bande nachgewiesen. Bei Tieren ohne Flp-Rekombinase konnte kein Produkt amplifiziert werden.

Nach den beiden beschriebenen Kreuzungsschritten wurden nun Tiere mit den Genotypen MC2-R<sup>+loxP</sup>;Cre<sup>-</sup> und MC2-R<sup>+loxP</sup>;Cre<sup>+</sup> verpaart. Aus dieser Kreuzung sollten zu 25% Tiere mit MC2-R<sup>loxP/loxP</sup> Genotyp resultieren. Allerdings war es auch nach Überprüfung der Eltern-Genotypen und mehreren Verpaarungen nicht möglich, einen solchen Genotyp per PCR nachzuweisen. Im Falle eines homozygoten Genotyps wäre bei Verwendung der Primer fGT1+4 nur die loxP-Bande und keine Wildtyp-Bande vorhanden gewesen. Auch methodische Fehler wie die Verunreinigung mit Wildtyp-DNA wurden ausgeschlossen. Eine mit denselben Primern durchgeführte Sequenzierung zeigte das erwartete Ergebnis zweier überlagerter Signale (Wildtyp und loxP), sonst aber keine Auffälligkeiten, sodass von korrekter Primerbindung und -funktion ausgegangen werden konnte.

Nach Ausschluss aller möglichen Fehlerursachen lag die einzige sinnvolle Erklärung darin, dass es bei der Generierung der Maus nicht zu einer homologen Rekombination sondern zu einer Insertion des TV an einer nicht erwarteten Stelle gekommen sein musste. Wie beschrieben war der zur Rekombinationskontrolle durchgeführte Southern-Blot nach 3' positiv. Hier musste der Targeting-Vektor also korrekt inseriert haben. Im Falle des MC2-R war eine Southern-Blot-Analyse nur auf der 3'-Seite des TV möglich, da im 5'-Bereich des Gens viele repetitive DNA-Sequenzen liegen, welche die Generierung einer spezifischen Sonde für diesen Bereich verhinderten. Durch diese technische Limitierung war eine sichere Aussage über die Lage des TV anhand der Southern Blot Analyse nicht möglich. Neben einer homologen Rekombination wäre bei gleichem Ergebnis des Southern Blots auch eine Integration des TV kurz hinter der 3' gelegenen ApaLI/XhoI-Schnittstelle möglich. Wäre dies der Fall, so würde die Southern-Blot-Analyse ebenfalls positiv ausfallen, da ein entsprechendes MT-Fragment ja vorhanden ist (s. Abb. 3.1). Allerdings könnte man in diesem Fall den MC2-R durch die Cre-Rekombinase nicht komplett aus dem Genom entfernen, da der TV mit dem loxP-flankierten MC2-R zusätzlich zum ursprünglichen MC2-R (und nicht stattdessen) vorhanden wäre. Somit würde durch die Cre-Rekombinase zwar der loxP-flankierte MC2-R entfernt werden, der Wildtyp-MC2-R würde aber verbleiben und somit wäre kein *knock-out* möglich. Die Vermutung war, dass der beschriebene Fall bei der vorhandenen Maus eingetreten ist, aber nicht überprüft worden war, da mit solch einem Ereignis nicht gerechnet worden war und die Southern-Blot-Analyse das erwartete Ergebnis gezeigt hatte.

Der Fehler lag höchstwahrscheinlich 5' des TV aber noch vor der 3'-Sonde des Southern-Blots, da dieser sonst nicht das erwartete Ergebnis geliefert hätte. Der Targeting-Vektor muss demnach knapp 5' der entsprechenden Wildtyp-Sequenz ins Genom inseriert und war somit zusätzlich und nicht statt dieser vorhanden. Ein Tamoxifen-induzierter *knock-out* des MC2-R war daher nicht mehr möglich, stattdessen lag in Tieren, welche den TV heterozygot oder

homozygot trugen, eine Überexpression des MC2-R vor. Bei genauerer Betrachtung der Gelelektrophorese einer MC2-R-Genotypisierung ist der Unterschied zwischen MC2-R<sup>+/loxP</sup> und MC2-R<sup>loxP/loxP</sup> zu vermuten (s. Abb. 3.7):



**Abb. 3.7: Unterscheidung von MC2-R<sup>+/loxP</sup> und MC2-R<sup>loxP/loxP</sup> sowie die genomische Situationen**

**A)** Wildtyp-Maus mit zwei Allelen des MC2-R

**B)** Situation nach erfolgreicher homologer Rekombination

**C)** Bei einem heterozygoten (MC2-R<sup>+/loxP</sup>) Tier ist der TV auf einem Allel zusätzlich vorhanden, hier ist die loxP-Bande schwächer als die Wildtyp-Bande.

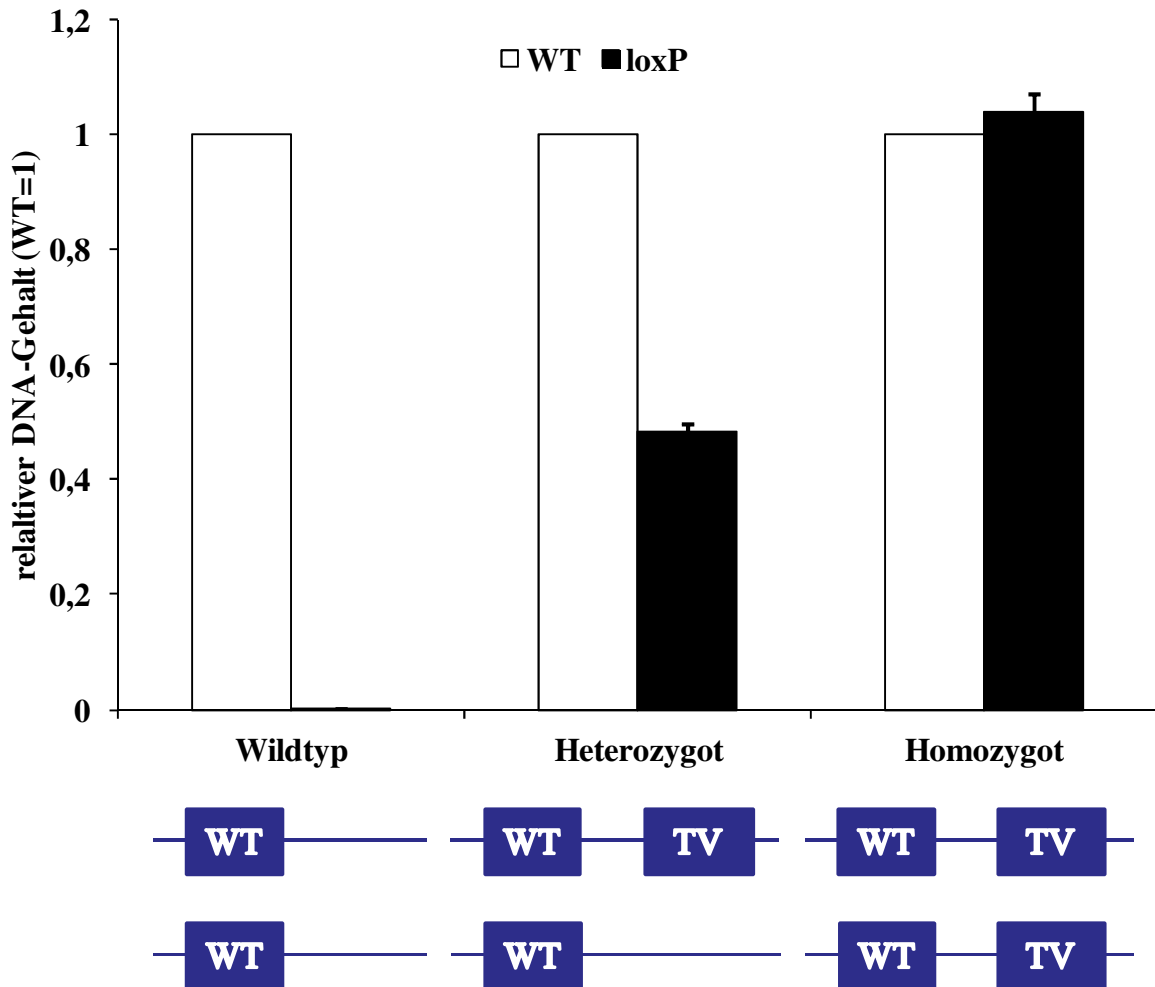
**D)** Bei einem homozygoten Tier (MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>) sind loxP- und Wildtyp-Bande gleich stark, da für die PCR gleiche Mengen an Ausgangs-DNA vorhanden sind.

Nach diesen Befunden entschieden wurde entschieden, statt der ursprünglich geplanten *knock-out*-Experimente die Auswirkung einer MC2-R-Überexpression *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. Um eine möglichst starke Überexpression zu erreichen, sollten für die folgenden Experimente nur MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tiere verwendet werden, also solche Tiere, die auf beiden Allelen sowohl den Wildtyp-MC2-R als auch zusätzlich den loxP-flankierten MC2-R trugen. Allerdings war zur Unterscheidung von hetero- von homozygoten Tieren die o.g. Analyse

mittels PCR und Gelelektrophorese nicht ausreichend zuverlässig. Um eine genaue Differenzierung der beiden Genotypen durchführen zu können, wurden Primer mit selektiver Bindungsstelle im TV oder in der Wildtyp-Sequenz des MC2-R generiert. Die beiden Primer für den Nachweis des TV wurden im Bereich der *loxP-sites* positioniert. Da in Wildtyp-DNA keine *loxP-sites* vorhanden sind, konnte hier nur ein Produkt amplifiziert werden, wenn der TV vorhanden war. Umgekehrt gibt es in der Wildtyp-DNA kurze, im TV nicht vorhandene Sequenzen, die bei der Insertion der *loxP-sites* in die DNA entfernt wurden. Somit konnte auch bei Wildtyp-Tieren eine spezifische Amplifikation erreicht werden.

Mit den beschriebenen Primern wurde jeweils eine qRT-PCR mit DNA von zu analysierenden Tieren durchgeführt. So war es möglich, den relativen DNA-Gehalt von TV- zu Wildtyp-DNA zu bestimmen und so zuverlässig zwischen MC2-R<sup>+/*loxP*</sup> (heterozygoten) von MC2-R<sup>*loxP/loxP*</sup> (homozygoten) Tieren zu unterscheiden. Mit dieser Methode konnten Tiere für die weitere Zucht sowie zur Versuchsdurchführung zuverlässig selektioniert werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 3.8) zeigt exemplarisch die Genotypisierung von 32 Tieren. Dabei sind der relative DNA-Gehalt der Wildtyp-MC2-R und *loxP*-Sequenzen der Tiere von verschiedenen Gruppen sowie die zu den Genotypen gehörenden genomischen Situationen dargestellt.



**Abb. 3.8: Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Tieren mittels qRT-PCR (n=32)**

Bei Wildtyp-Tieren war nur die Wildtyp-DNA (WT) aber kein Targeting Vektor (TV) und somit keine loxP-DNA vorhanden, daher zeigte sich auch kein loxP-Signal.

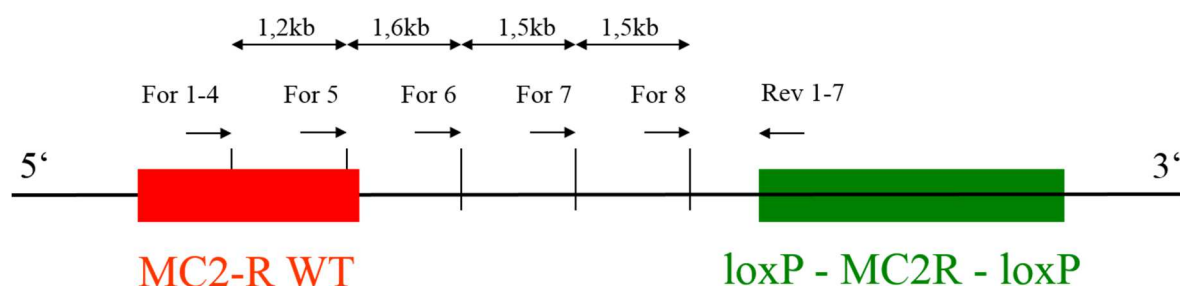
Bei heterozygoten Tieren war der loxP-flankierte MC2-R (TV) auf einem Allel vorhanden, daher war das loxP-Signal etwa halb so stark wie das Wildtyp-Signal.

Bei homozygoten Tieren war auf beiden Allelen sowohl der loxP-flankierte MC2-R als auch der Wildtyp-MC2-R vorhanden und die Signale daher etwa gleich stark.

### 3.2 Versuch der exakten TV-Lokalisierung

Um das entstandene Konstrukt noch genauer klassifizieren zu können, sollte die Position des TV exakt bestimmt werden. Wie oben beschrieben war dabei zwar bekannt, dass der TV theoretisch 3' des Wildtyp-MC2-R liegen musste, nicht aber dessen genaue Position. Zur Lokalisierung wurden verschiedene Primer generiert. Diese lagerten sich am Ende oder kurz hinter der Wildtyp-MC2-R-Sequenz und am Anfang des TV an. Außerdem wurden alle Primer noch einmal invertiert verwendet, um auch ein Produkt zu erhalten, falls sich die DNA-Stränge

bei der Insertion gedreht haben sollten. Theoretisch hätte man mit geeigneten Primern bei einem nicht zu großen Abstand ein spezifisches Produkt amplifizieren können müssen. Trotz aufwendiger Versuche einschließlich der Verwendung verschiedenster PCR-Bedingungen und aller Primerkombinationen war es aber nicht möglich, eine spezifische Bande zu finden. Ein möglicher Grund dafür ist eine zu große Entfernung der Primer voneinander. Auch die Verwendung sog. Alu-Primer (Primer die an repetitiven DNA-Sequenzen binden) führte nicht zum Erfolg. Die nächste Abbildung zeigt schematisch die vermutete Situation im Genom der generierten Maus, die Bindungsstellen der verwendeten Primer und die Restriktionsenzym-schnittstellen. Die genaue Position des TV war also weiter unklar. Da der MC2-R aber sicher überexprimiert war, wurden die weiteren Experimente wie geplant durchgeführt.



**Abb. 3.9: Primerpositionen zur Lokalisierung des TV (loxP-MC2-R-loxP)**

Verschiedene *forward* (For) und *reverse* (Rev) Primer wurden miteinander kombiniert, um ein spezifisches Produkt zwischen MC2-R-Wildtyp-Sequenz und TV zu amplifizieren.

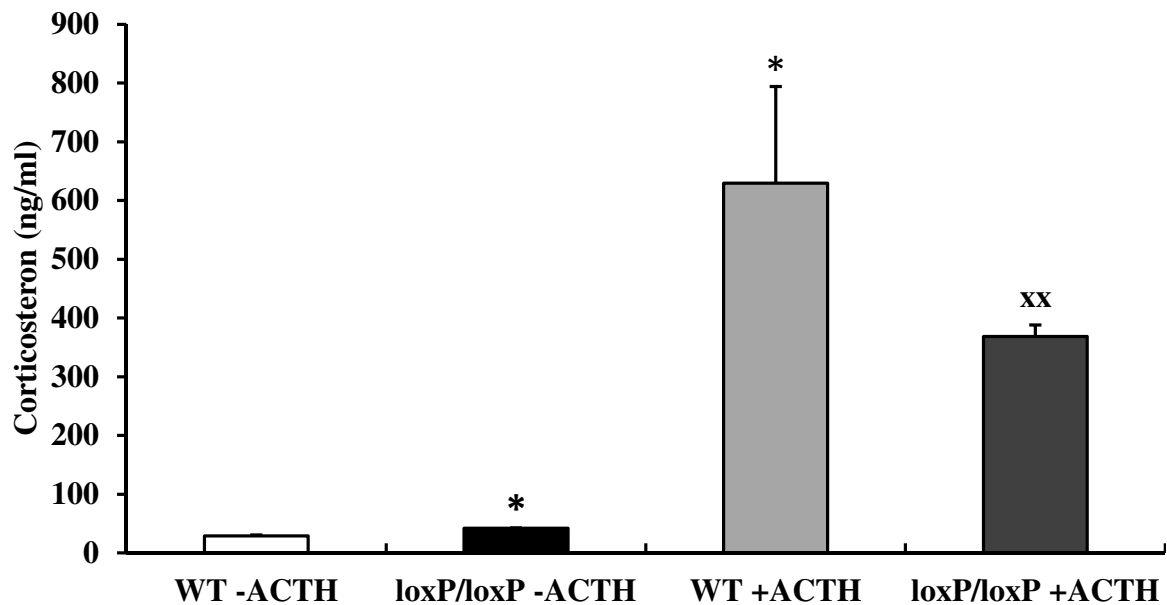
### 3.3 Untersuchung der Nebennieren; Corticosteron- und ACTH-Messung

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine MC2-R-Überexpression Auswirkungen auf die Genexpression sowie die Corticosteron-Produktion der Nebennieren hat. Die Corticosteronproduktion wurde einerseits *in vivo* und andererseits *ex vivo* an Primärkulturzellen aus Nebennieren bestimmt. Durch die Verwendung von Primärkulturzellen konnte sichergestellt werden, dass die Werte nicht durch Stress der Tiere verfälscht werden und ermöglichte eine einfache, direkte Stimulation mit ACTH.

Um die Corticosteron-Produktion *ex vivo* zu quantifizieren, wurden Nebennieren von Wildtyp- und MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Weibchen entnommen und in Primärkultur überführt. In beiden Gruppen wurde die Corticosteron-Konzentration nach einstündiger ACTH-Stimulation sowie ohne Stimulation mittels EIA gemessen. Die Werte wurden auf die jeweils extrahierte RNA-Menge als Maß für die Zellzahl normiert. Bei Wildtyp-Tieren zeigte sich nach Stimulation ein

## Ergebnisse

signifikanter Anstieg der Corticosteron-Konzentration, ebenso wie bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tieren, der Anstieg fiel hier allerdings geringer aus. Der basale Corticosteron-Spiegel war bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tieren allerdings höher als bei Wildtyp-Tieren.



**Abb. 3.10: Messung der Corticosteronkonzentration im Überstand der Nebennieren-Primärkulturzellen (n=3)**

\*: Signifikanz gegenüber WT -ACTH (  $p < 0,05$  )

xx: Signifikanz gegenüber loxP/loxP -ACTH (  $p < 0,01$  )

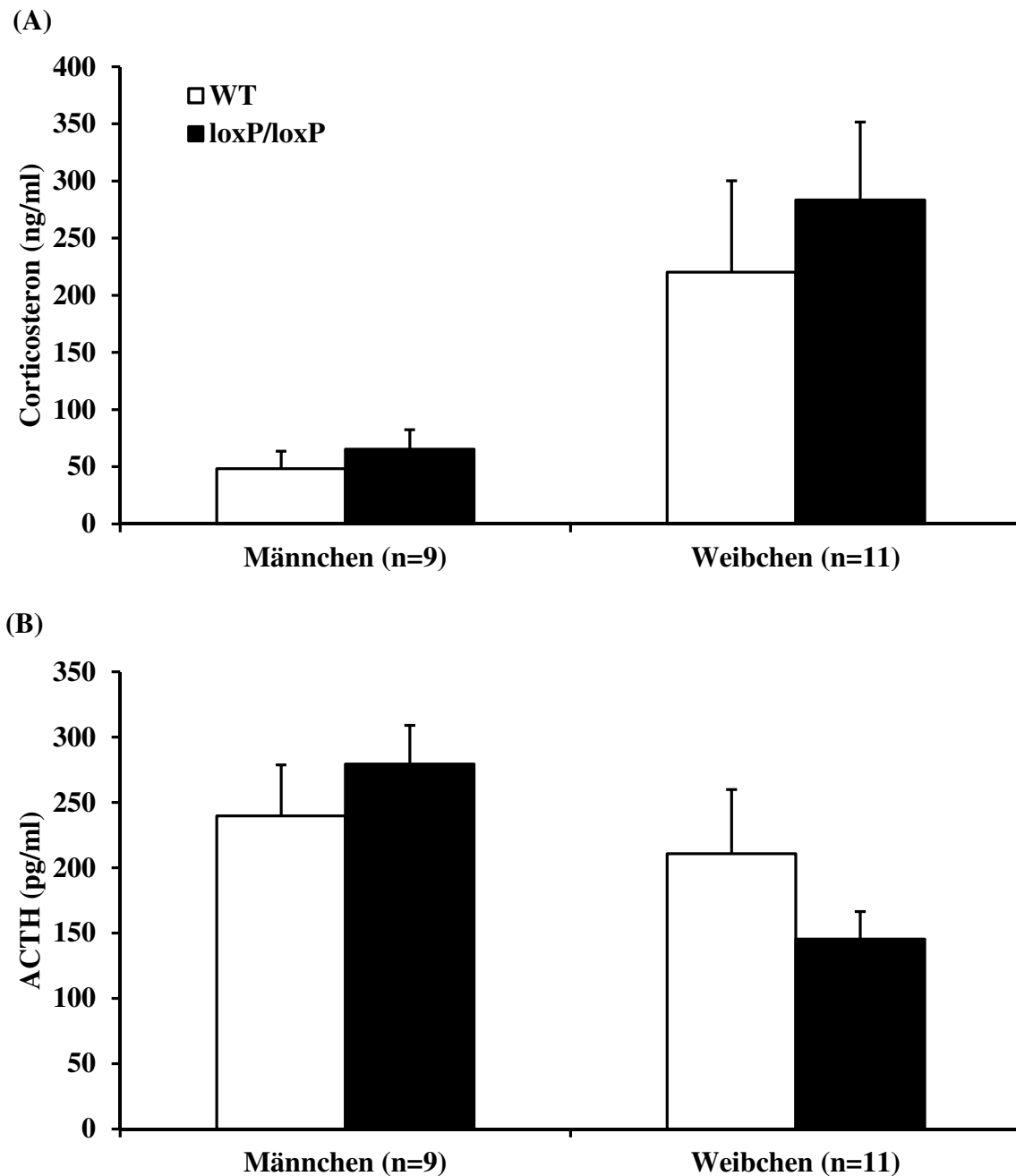
**WT:** Wildtyp-Tier; **loxP/loxP:** MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tier

**-ACTH:** Kontrolle (keine Stimulation); **+ACTH:** einstündige ACTH-Stimulation

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

Zusätzlich zur Corticosteronproduktion von Nebennierenzellen *ex vivo* wurden mittels EIA bzw. ELISA auch die Corticosteron- und ACTH-Spiegel im Blut der Mäuse gemessen. In den Experimenten zeigten sich keine Unterschiede zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Kontrollgruppe. Die Corticosteronspiegel bei Weibchen waren allerdings sehr viel höher als bei Männchen, wohingegen die ACTH-Spiegel sich in etwa glichen.





**Abb. 3.11: Corticosteron- und ACTH-Spiegel im Blut**

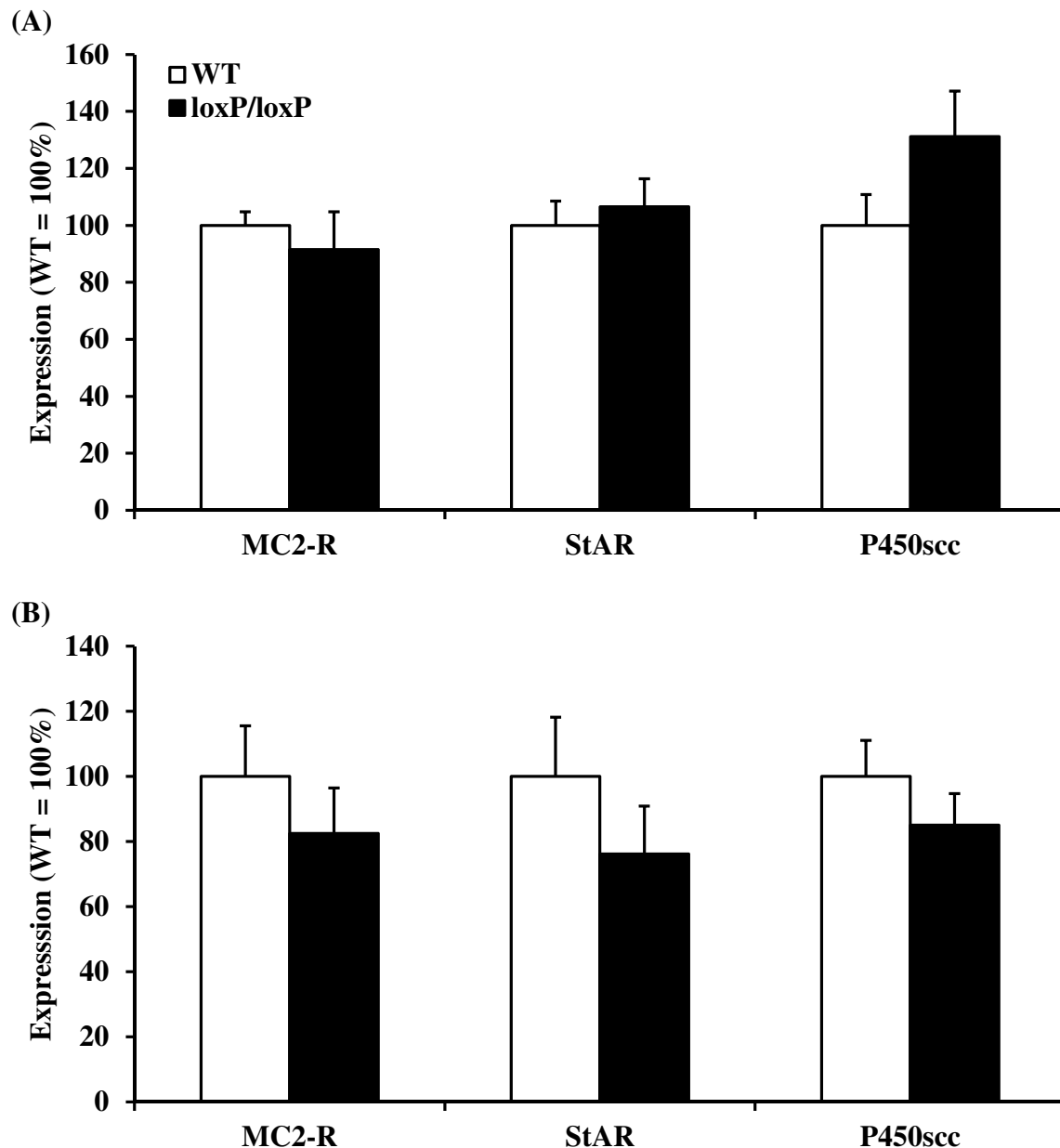
(A) Corticosteron; (B) ACTH

WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

Neben der Corticosteronproduktion *in vivo* wurden auch die Genexpression des MC2-R und von Enzymen der Steroidhormonbiosynthese in den entnommenen Nebennierenzellen verglichen (Abb. 3.12). Dabei wurde die Expression der Gene  $\beta$ -Actin als *housekeeping-gene*, MC2-R, StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) sowie P450scc (*Cholesterol side-chain cleavage enzyme*) analysiert. Die beiden letztgenannten Enzyme sind essentiell für die Steroidhormonbiosynthese. StAR transportiert Cholesterin von der äußeren zur inneren

## Ergebnisse

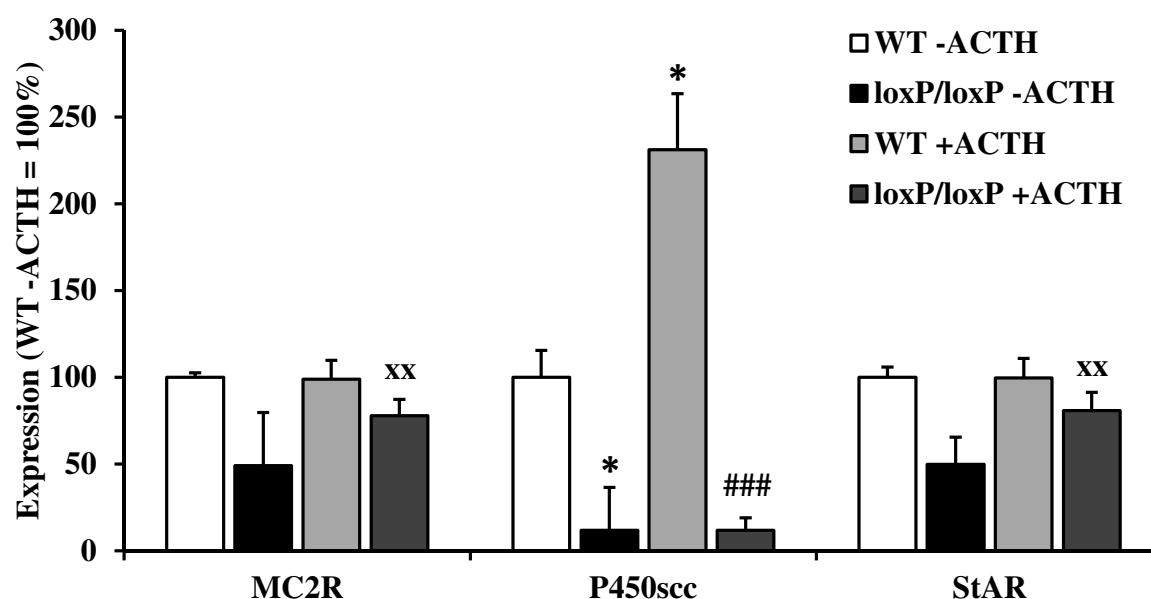
Mitochondrienmembran und ist somit kein eigentliches Enzym der Steroidhormonbiosynthese. Da die Bereitstellung von Cholesterin aber essentiell für die Steroidhormonbiosynthese ist, stellt das StAR-Enzym einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für diese dar. P450scc ist das erste Enzym der Steroidhormonbiosynthese und katalysiert die Umwandlung von Cholesterin zu Pregnenolon. Bei der Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden werden.



**Abb. 3.12: Genexpression in Nebennieren *in vivo* (n=7)**

(A) Männchen; (B) Weibchen; WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

Durch den Vergleich von *in vivo* und *ex vivo* Daten sollte zwischen hypophysären und zellulären Effekten unterschieden werden. Die Analyse der Genexpression von Primärkulturzellen zeigte in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe unter ACTH-Stimulation einen signifikanten Anstieg der MC2-R- und StAR-Expression. In der Kontrollgruppe war dieser Unterschied nicht festzustellen. Bemerkenswert ist auch, dass die Expression von P450scc in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe sehr viel niedriger war als in der Kontrollgruppe und die Expression auch nur in der Kontrollgruppe durch ACTH-Stimulation gesteigert werden konnte.



**Abb. 3.13: Messung der Genexpression in Nebennieren-Primärkulturzellen (n=3)**

\*: Signifikanz gegenüber WT -ACTH (p < 0,05)

xx: Signifikanz gegenüber loxP/loxP -ACTH (p < 0,01)

### = Signifikanz gegenüber loxP/loxP +ACTH (p < 0,001)

WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

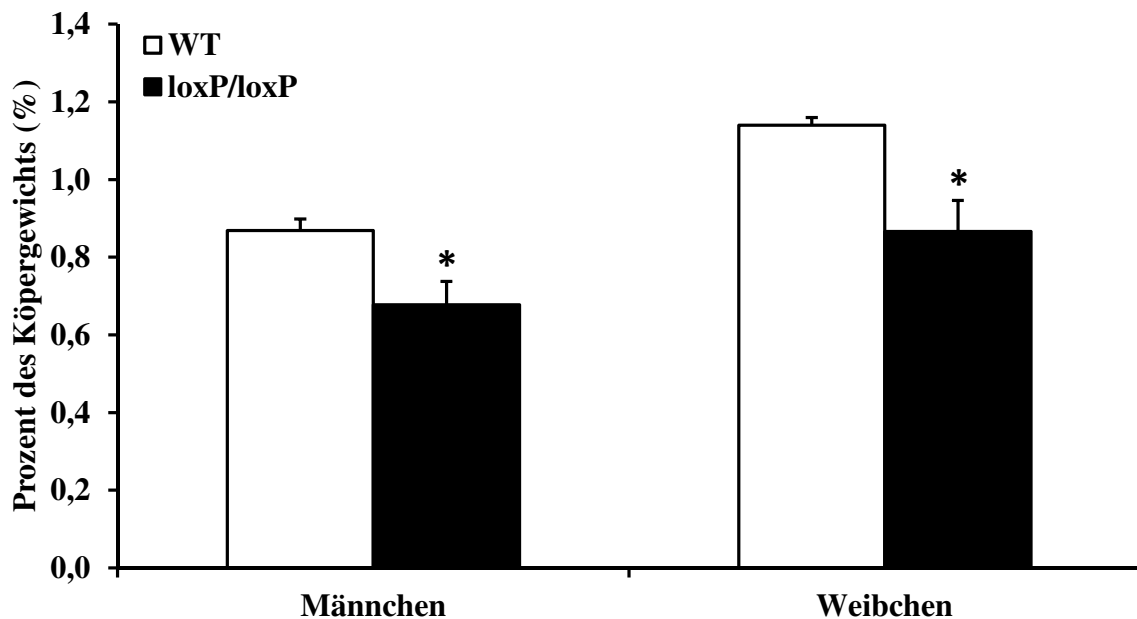
-ACTH: Kontrolle (keine Stimulation); +ACTH: 6-stündige ACTH-Stimulation

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

### 3.4 Analyse des subcutanen und viszeralen Fettgewebes

Neben den Effekten auf die Nebennieren waren vor allem die Auswirkungen auf das subcutane und das viszerale Fettgewebe von Interesse. Wiederum wurden Tiere beider Geschlechter untersucht. Nach Präparation der jeweiligen Fett-Depots wurden diese gewogen. Dabei war sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen zu beobachten, dass das subcutane Fettgewebe bezogen auf das Körpergewicht in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe signifikant leichter war als in der

Kontrollgruppe. Bei den absoluten Körpergewichten zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied.



**Abb. 3.14: Anteil des subcutanen Fettgewebes am Körpergewicht (n=7)**

\* = Signifikanz gegenüber +/+ ( $p < 0,05$ )

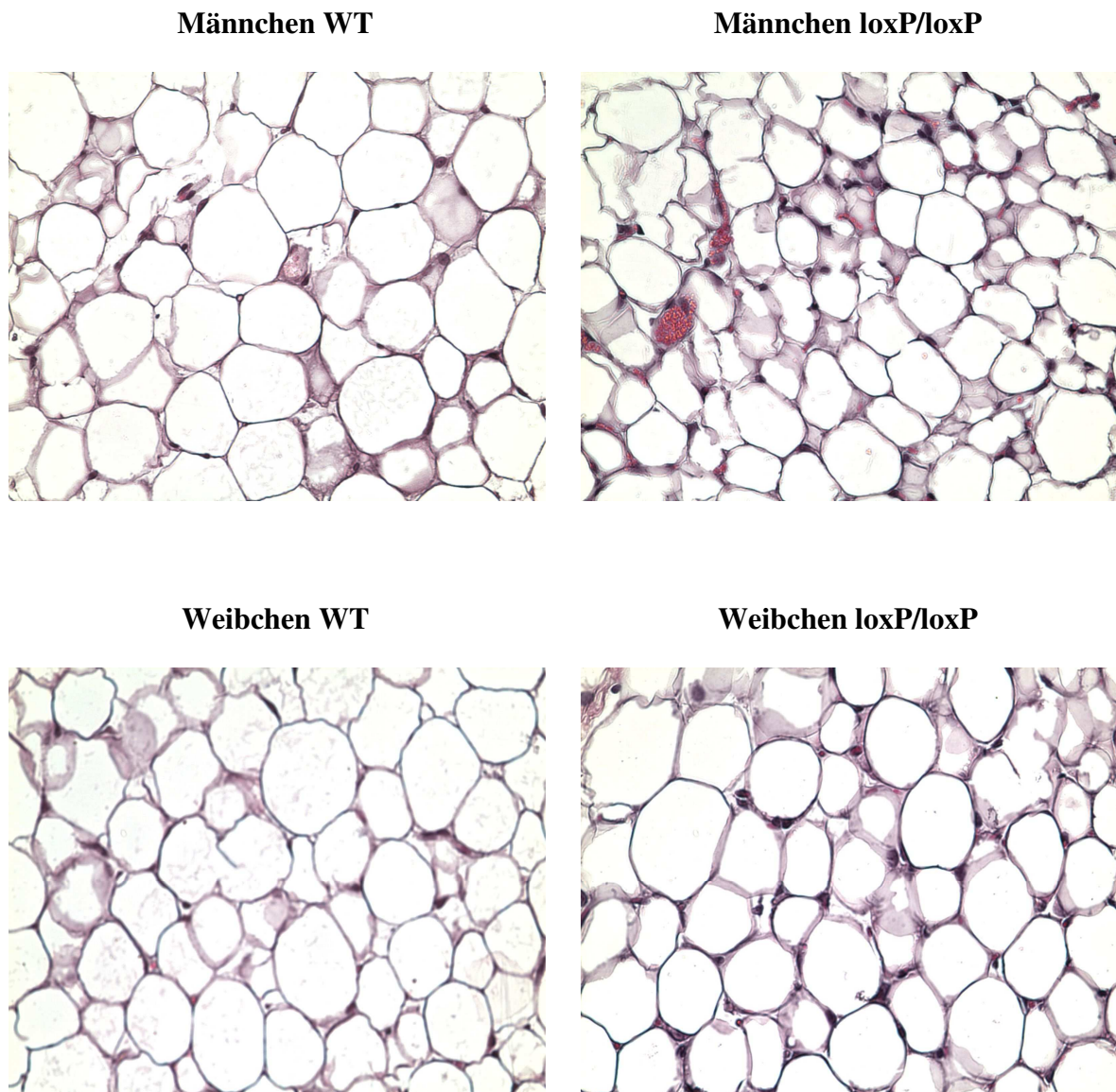
WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

Nach der Gewichtsbestimmung wurden die Fett-Proben zur RNA-Extraktion und zur anschließenden Genexpressionsanalyse genutzt.

Einige Proben wurden in Paraffin zur histologischen Aufarbeitung eingebettet. Bei der, mithilfe eines Computerprogrammes durchgeführten, Analyse der Adipozytengröße fiel auf, dass bei Männchen die Adipozyten von MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tieren signifikant kleiner waren als bei Wildtyp-Tieren. Bei Weibchen gab es hier keinen signifikanten Unterschied.

Die Abbildungen Abb. 3.15 und Abb. 3.16 zeigen histologische Bilder des subcutanen Fettgewebes der verschiedenen Gruppen sowie die daraus ermittelte durchschnittliche Adipozytengröße.

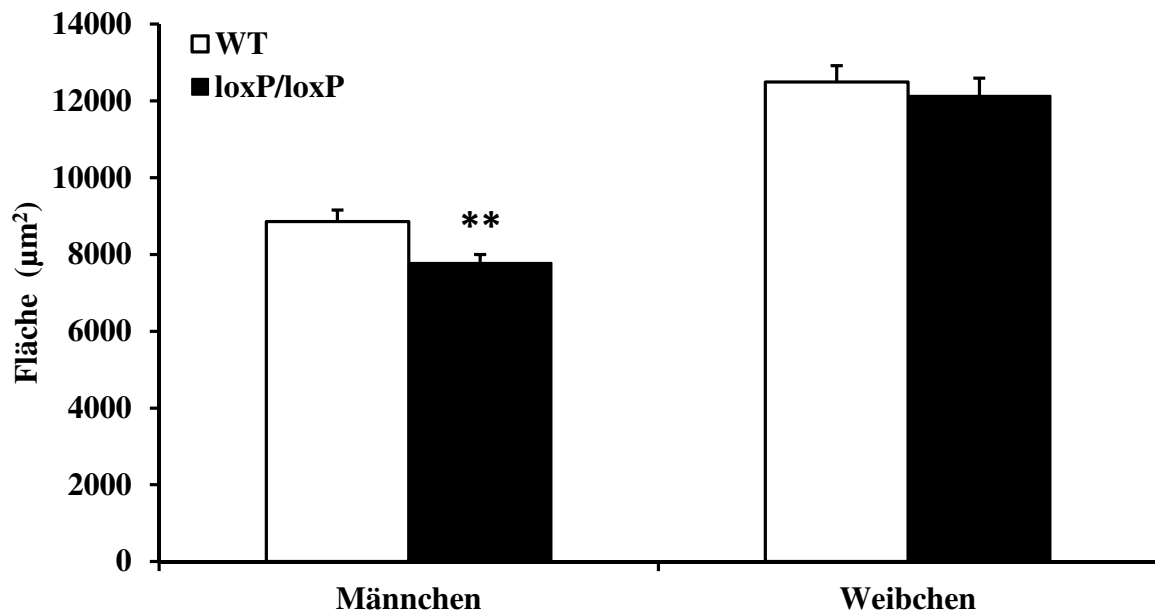


**Abb. 3.15: Histologie des subcutanen Fettgewebes von Männchen und Weibchen**

Die Schnitte wurden mittels HE-Methode gefärbt. Die Ausschnitte zeigen bei 40-facher Vergrößerung repräsentative Ausschnitte aus den Schnitten der jeweiligen subcutanen Fettgewebe.

Wie durch die Auswertung mittels Computerprogramm bestätigt werden konnte zeigt sich, dass die Adipozyten der  $MC2-R^{loxP/loxP}$ -Männchen kleiner sind als die der Kontrollgruppe.

**WT:** Wildtyp;  **$loxP/loxP$ :**  $MC2-R^{loxP/loxP}$



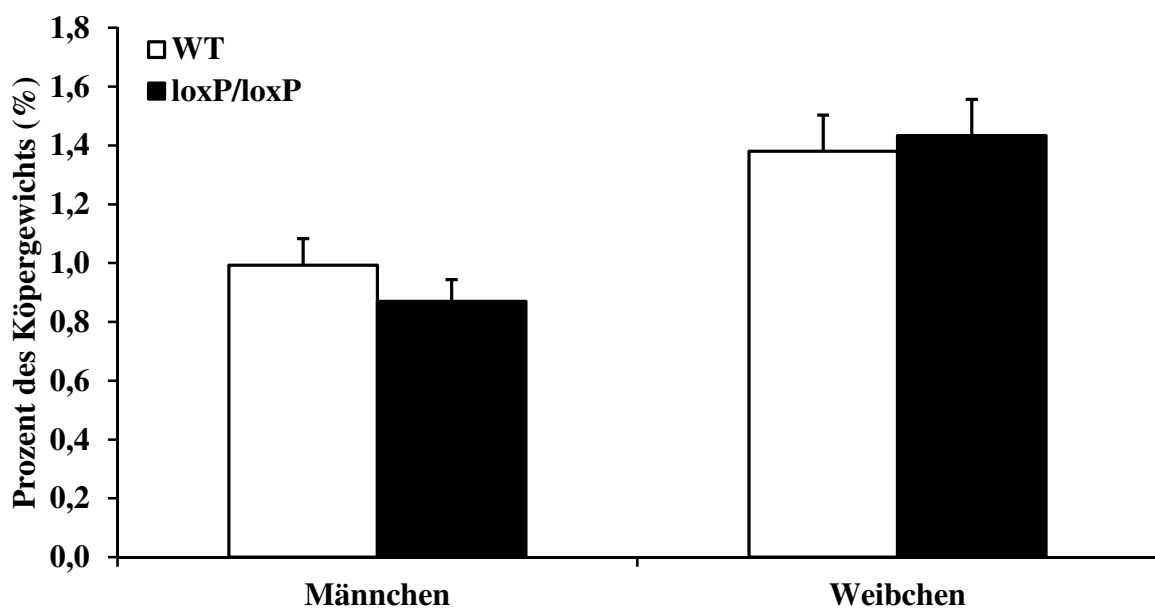
**Abb. 3.16: Durchschnittliche Adipozytengrößen des subcutanen Fettgewebes (n=6)**

\*\* = Signifikanz gegenüber WT Männchen ( $p < 0,01$ )

WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

Beim viszeralen Fettgewebe ergab sich hinsichtlich des prozentualen Fettgewichts kein signifikanter Unterschied, daher wurde auf eine histologische Aufarbeitung verzichtet.



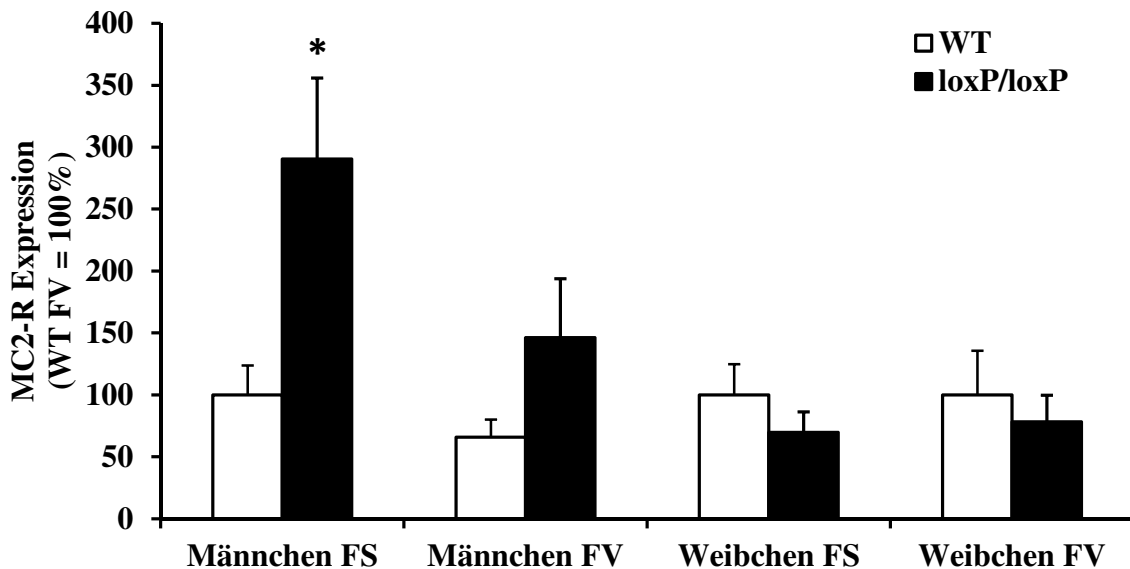
**Abb. 3.17: Anteil des viszeralen Fettgewebes am Körpergewicht (n=7)**

WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

## Ergebnisse

Die aus den Fettgeweben extrahierte RNA wurde zur Analyse der Genexpressionsniveaus verwendet. Dabei wurde die Expression folgender Gene analysiert: MC2-R, hormonsensitive Lipase (HSL), Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), Perilipin, PPAR $\gamma$ 1 und PPAR $\gamma$ 2. HSL und ATGL sind Hormone der Lipolyse und spalten Fettsäurereste von Tri- bzw. Diacylglyceriden ab (s. Abb. 1.1). Perilipin wirkt antilipolytisch indem es Lipidtropfen vor dem Zugriff der HSL schützt und gilt als Marker für die vorhandene Fettmenge. PPAR $\gamma$ 1&2 fördern die Adipogenese, die Aufnahme von Lipiden in Fettzellen sowie die Glucoseaufnahme in Zellen [139]. Dabei wird PPAR $\gamma$ 1 ubiquitär exprimiert, wohingegen PPAR $\gamma$ 2 vor allem in Fettzellen und schwächer auch im Darm exprimiert wird [140]. Des Weiteren wurde die Expression von ribosomaler 18S-RNA zum Zwecke der Normalisierung gemessen [141].

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Expressionsniveaus der verschiedenen Gene in den jeweiligen Gruppen dargestellt. Darüber hinaus wurde die Expression des MC2-R in subcutanem und viszeralem Fettgewebe verglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-und Kontrollgruppe konnte bezüglich der MC2-R-Expression bei Männchen im subcutanen Fettgewebe nachgewiesen werden. Für die übrigen untersuchten Gene ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.



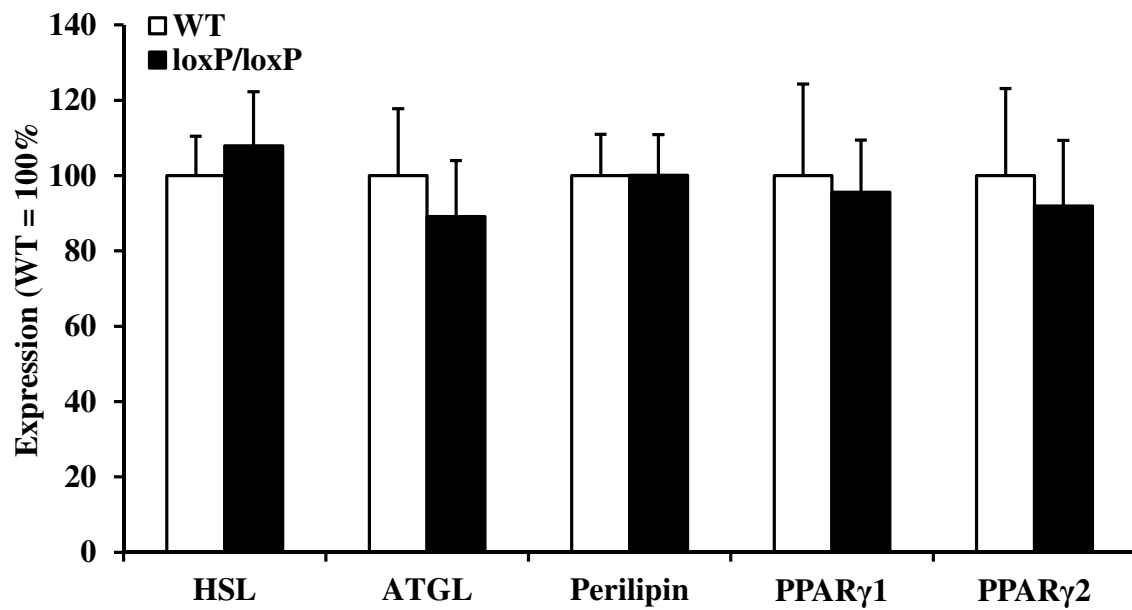
**Abb. 3.18: Vergleich der MC2-R-Expression in subcutanem und viszeralem Fettgewebe (Männchen: n=9; Weibchen: n=11)**

\* = Signifikanz gegenüber WT Männchen FS ( p < 0,05)

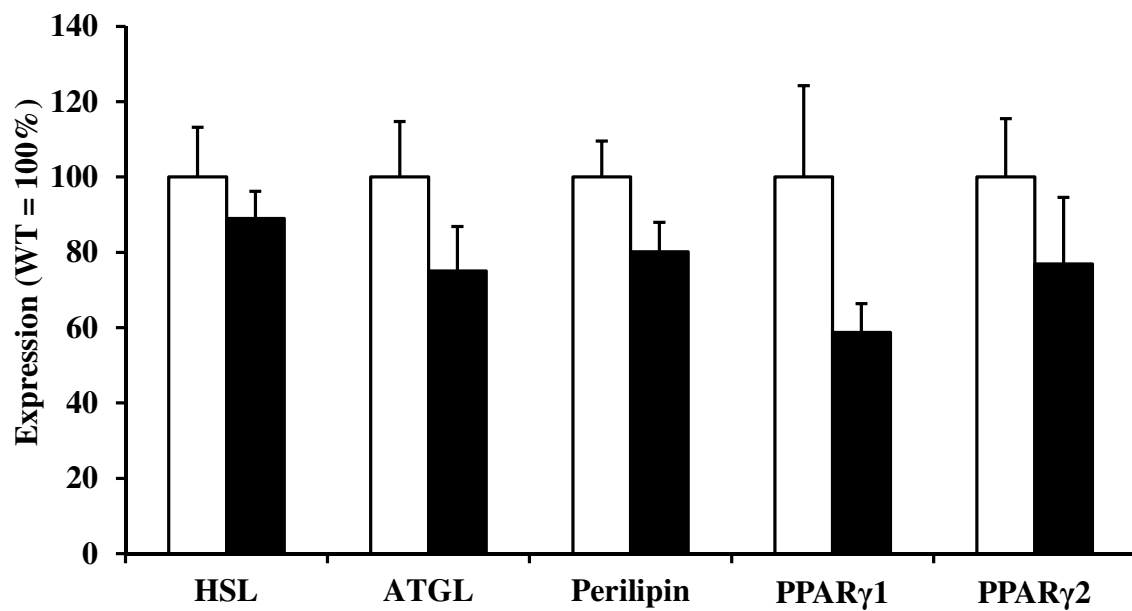
**WT:** Wildtyp; **loxP/loxP:** MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>; **FS:** subcutanes Fett; **FV:** viszerales Fett

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

(A)



(B)



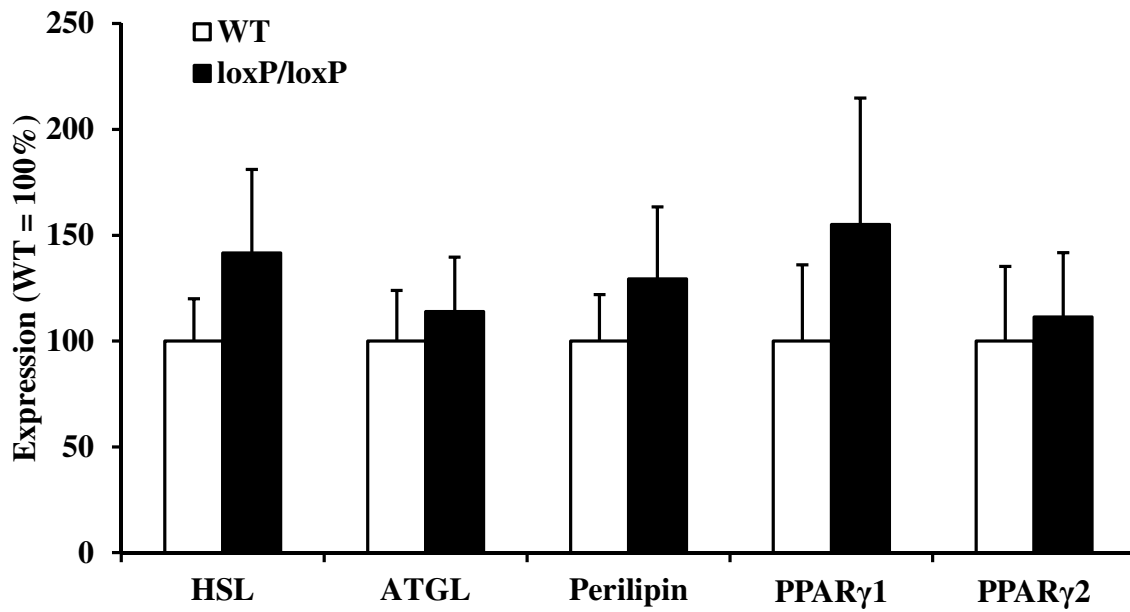
**Abb. 3.19: Genexpressionsanalyse des subcutanen Fettgewebes**

(A): Männchen (n=9), (B): Weibchen (n=11)

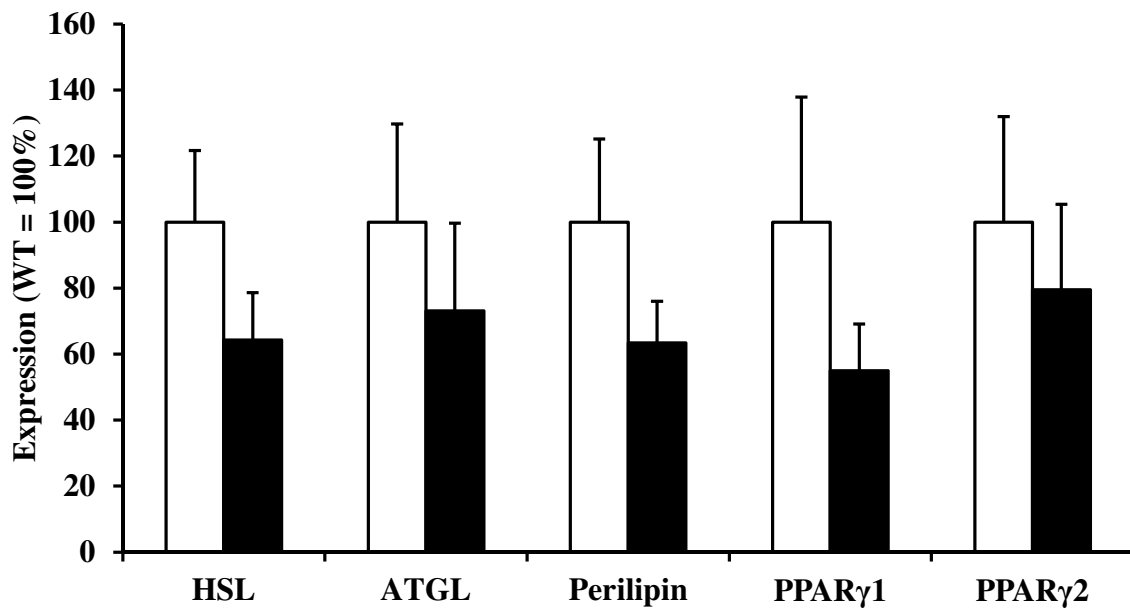
WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>



(A)



(B)



**Abb. 3.20: Genexpressionsanalyse des viszeralen Fettgewebes (n=9)**

(A): Männchen (n=9), (B): Weibchen (n=11)

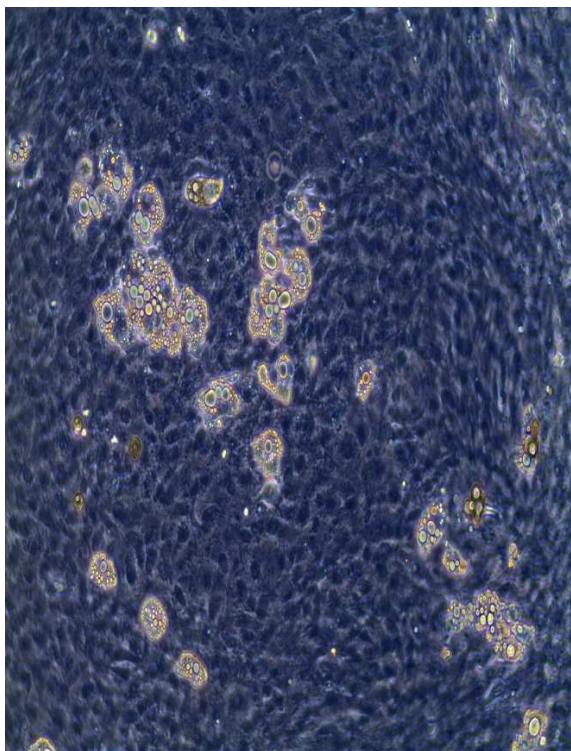
WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

### 3.5 Analyse von MEFs und daraus differenzierten Adipozyten

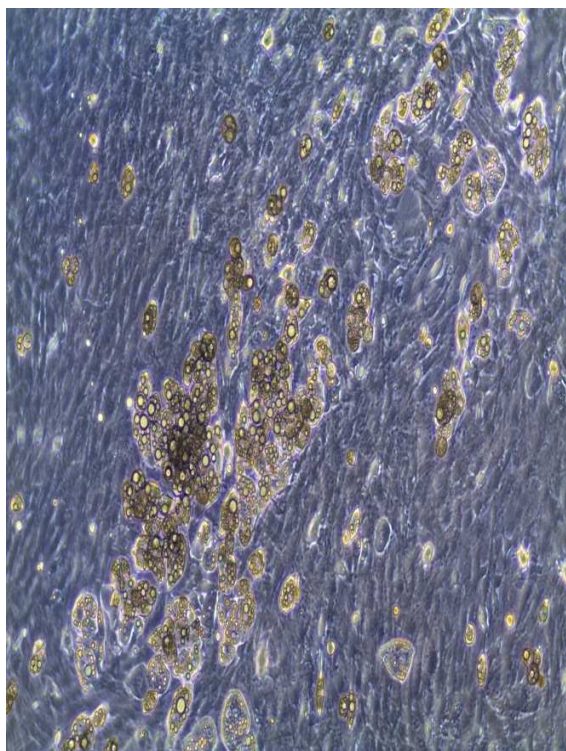
Aufgrund der beobachteten Veränderungen des subcutanen Fettgewichts sowie der MC2-R-Expression im subcutanen Fettgewebe war zu vermuten, dass fehlende Unterschiede der Genexpression *in vivo* auf Kompensationsmechanismen zurückzuführen sein könnten. Des Weiteren war von Interesse, ob die geringere Fettmasse durch eine mangelnde Adipozytenneogenese in der Embryonalzeit bedingt ist oder ob die Lipolyse in der darauffolgenden Zeit erhöht ist. Zur Beurteilung dieser Fragestellungen wurde ein *in vitro* Modell gewählt, da dort Kompensationsmechanismen fehlen bzw. noch nicht ausgebildet sind und sich das Differenzierungsverhalten der Zellen gut beobachten lässt. An diesem sollten *in vitro* die Auswirkungen der vermehrten Kopien des MC2-R-Gens im Genom auf die Genexpression, das Differenzierungsverhalten und die Lipolyseeigenschaften untersucht werden.

Dafür wurden aus ca. 14 Tage alten Embryonen embryonale Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) generiert. Diese wurden Verlauf zu Adipozyten differenziert. Neben Embryonen mit Wildtyp-Genotyp als Kontrollgruppe wurden auch solche mit MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Genotyp zur MEF-Gewinnung verwendet. Sobald eine ausreichende Anzahl von Zellen angezüchtet worden war, wurden diese zu Adipozyten differenziert und ihr Differenzierungsverhalten während dieser Zeit beobachtet. Dabei fiel während der Differenzierungsphase auf, dass bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen ein wesentlich höherer Anteil der Zellen zu Adipozyten differenzierte, während bei den Wildtyp-Zellen mehr Zellen im Fibroblastenstadium verblieben. Der Ausschnitt jeweils einer Vertiefung einer 12-Lochplatte bei 10-facher Vergrößerung mit MC2-R<sup>loxP/loxP</sup> bzw. Wildtyp-Zellen ist in Abb. 3.21 zu sehen. Es ist deutlich erkennbar, dass die Differenzierung bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen ausgeprägter zu sein scheint als bei Wildtypzellen. Zum einen sind hier mehr Adipozyten vorhanden, zum anderen weisen diese auch mehr Lipidtröpfchen auf. Diese Tendenz wurde durchgehend bei allen MEFs beobachtet.

(A) WT



(B) MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

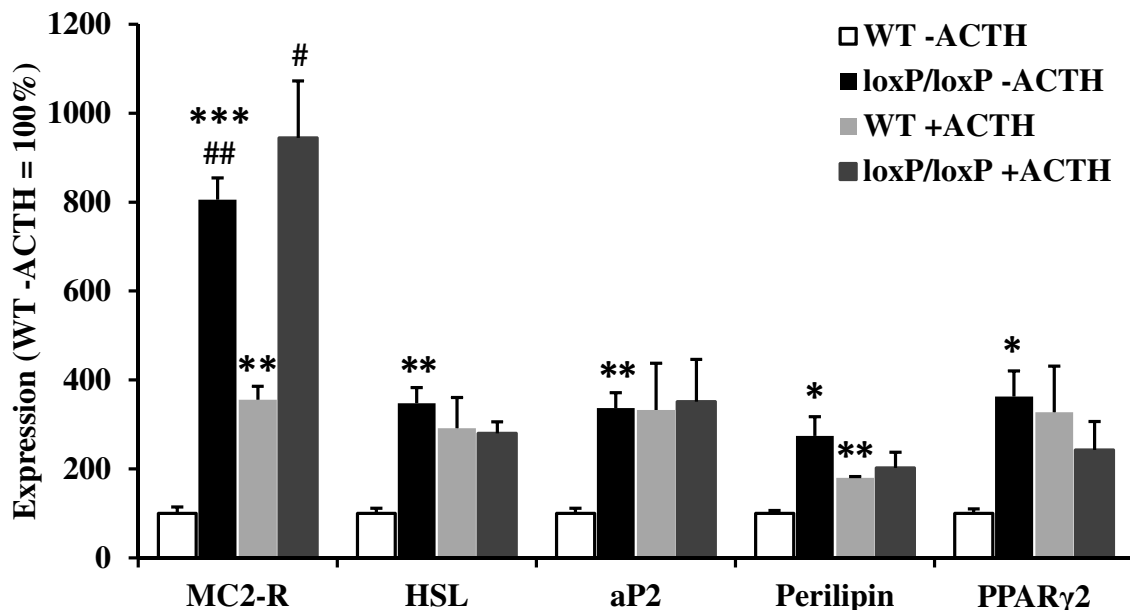


**Abb. 3.21: Differenzierung von MEFs zu Adipozyten**

Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte von Zellen zum selben Differenzierungsstadium bei 10-facher Vergrößerung.

Die Adipozyten erscheinen gelblich, teilweise sind auch Lipidtropfen erkennbar. Die Fibroblasten sind bläulich. Man erkennt, dass in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich mehr Fibroblasten zu Adipozyten differenziert sind.

Sobald die Differenzierung abgeschlossen war, wurde ein Teil der Zellen mit ACTH stimuliert (in zwei getrennten Versuchen einmal sechs Stunden, einmal 48 Stunden lang). Daraufhin wurde aus den stimulierten Zellen sowie aus nicht stimulierten Kontrollzellen RNA extrahiert und wiederum eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurden folgende Gene untersucht, die zuvor im Fettgewebe gemessen worden waren: MC2-R, HSL, Perilipin und PPAR $\gamma$ 2. Zusätzlich wurde die Expression des *adipocyte Protein 2* (aP2) bestimmt, welches die Differenzierung von Adipozyten fördert und in der Lipolyse eine wichtige Rolle spielt [154]. Wie bei den extrahierten Fettgeweben wurde ribosomale 18S-RNA zur Normierung verwendet.



**Abb. 3.22: Genexpressionsanalyse von differenzierten MEF-Adipozyten nach sechsständiger ACTH-Stimulation (n=3)**

\* = Signifikanz gegenüber WT -ACTH (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)

# = Signifikanz gegenüber WT +ACTH (# p < 0,05; ## p < 0,01)

WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

-ACTH: Kontrolle (keine Stimulation); +ACTH: 6-stündige ACTH-Stimulation

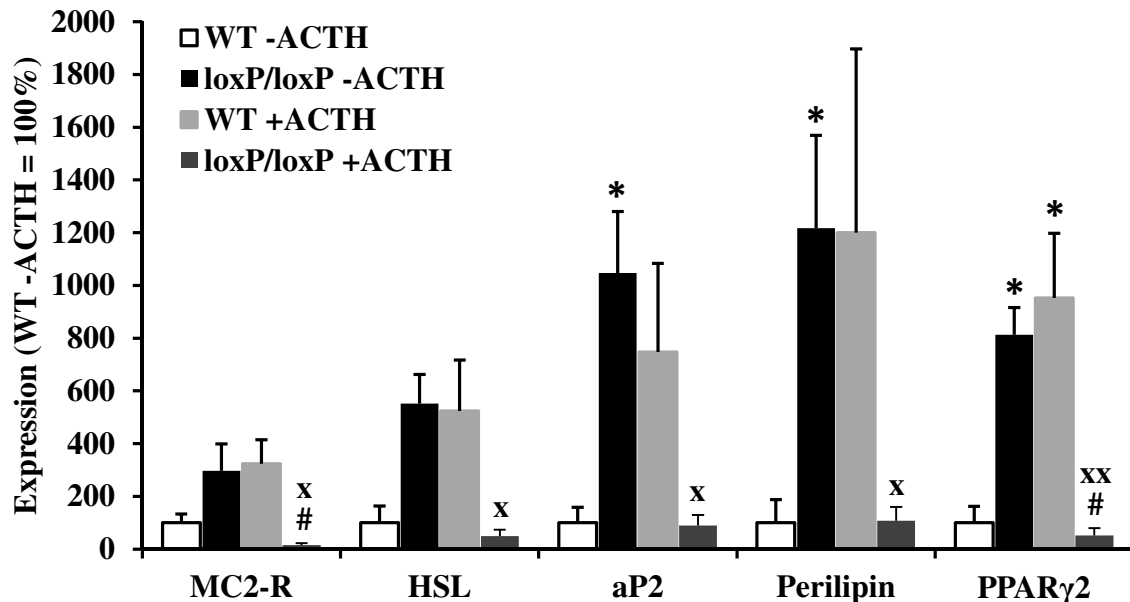
Signifikanztestung im Zweistichprobentest

Nach sechsständiger ACTH-Stimulation (s. Abb. 3.22) zeigte sich, dass unter Basalbedingungen bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen alle untersuchten Gene signifikant stärker exprimiert waren als bei Wildtyp-Zellen. Unter ACTH-Stimulation stieg bei Wildtyp-Zellen die Expression der entsprechenden Gene an, nicht jedoch bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen. Interessant ist auch, dass MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen schon unter Basalbedingungen die gleichen Expressionsstärken (im Falle des MC2-R sogar eine höhere Expression) aufwiesen wie Wildtyp-Zellen unter ACTH-Stimulation.

Zusammenfassend war die Genexpression in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup> Gruppe basal erhöht aber nicht mehr steigerbar, dagegen konnte in der Wildtypgruppe die Expression durch ACTH-Stimulation auf das Basalniveau der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe gesteigert werden.

Nach 48-stündiger ACTH-Stimulation (s. Abb. 3.23) wurde die Expression derselben Gene untersucht. In der Wildtyp-Gruppe war erwartungsgemäß analog zur sechsständigen Stimulation die Expression aller Gene nach Stimulation erhöht, auch wenn die Unterschiede hier überwiegend nicht signifikant waren. Unter Basalbedingungen war die Genexpression in

der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe wiederum höher als in der Kontrollgruppe. Sehr auffällig ist, dass die Genexpression nach 48-stündiger ACTH-Stimulation in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe abnahm, obwohl diese in derselben Gruppe nach sechsständiger ACTH-Stimulation gleichgeblieben war und in der Wildtyp-Gruppe nach sechs- und 48-stündiger Stimulation zugenommen hatte.



**Abb. 3.23: Genexpressionsanalyse von differenzierten MEF-Adipozyten nach 48-stündiger ACTH-Stimulation (n=3)**

\* = Signifikanz gegenüber WT -ACTH (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)

# = Signifikanz gegenüber WT +ACTH (#: p < 0,05; ##: p < 0,01)

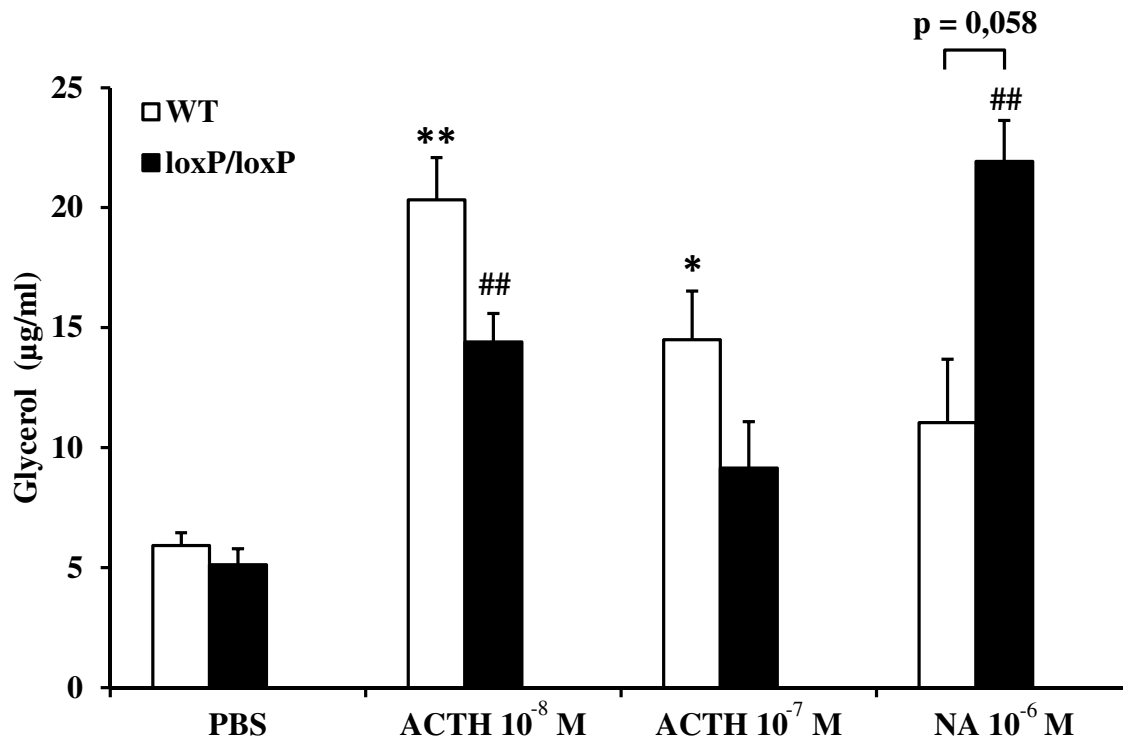
x = Signifikanz gegenüber loxP/loxP -ACTH (x: p < 0,05; xx: p < 0,01)

WT: Wildtyp; loxP/loxP: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>

-ACTH: Kontrolle (keine Stimulation); +ACTH: 6-stündige ACTH-Stimulation

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

Zusätzlich zur ACTH-Stimulation mit anschließender Genexpressionsanalyse wurde eine Lipolyse-Messung durchgeführt. Dafür wurden Zellen zwei Stunden lang mit PBS als Kontrolle, zwei verschiedenen ACTH-Konzentrationen ( $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M) sowie Noradrenalin ( $10^{-6}$  M) stimuliert. Anschließend wurde im Überstand die Glycerolkonzentration als Maß der Lipolyse gemessen. Um die Messung auf die Zellzahl zu normalisieren, wurden die Zellen nach Abnahme des Überstandes von den Behältnissen abgelöst und die Proteinkonzentration, die proportional zur Zellzahl ist, bestimmt.



**Abb. 3.24: Lipolysemessung von differenzierten MEF-Adipozyten (n=3) nach zweistündiger Stimulation**

\*: Signifikanz gegenüber +/+ PBS (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ )

#: Signifikanz gegenüber trans/trans PBS (#:  $p < 0,05$ ; ##:  $p < 0,01$ )

+/+ : Wildtyp; **trans/trans**: MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>; **PBS**: Kontrolle;

**ACTH 10<sup>-8</sup>/10<sup>-7</sup> M**: Stimulation mit ACTH in einer Konzentration von 10<sup>-8</sup>/10<sup>-7</sup> Mol/l;

**NA 10<sup>-6</sup> M**: Stimulation mit Noradrenalin in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> Mol/l

Signifikanztestung im Zweistichprobentest

Zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Wildtyp-Gruppe bestand bei keiner Stimulationssubstanz ein signifikanter Unterschied, allerdings zeigte sich im Falle der Noradrenalin-Stimulation der deutlichste Unterschied ( $p=0,058$ ). Neben dem erwarteten (wenn auch im Wildtyp-Fall nicht signifikanten) Anstieg der Glycerolkonzentration durch Noradrenalin-Stimulation war bemerkenswert, dass die Stimulation mit ACTH die Glycerolkonzentration in allen Proben (außer loxP/loxP ACTH 10<sup>-7</sup> M) signifikant erhöhte und die Steigerung bei einer niedrigeren ACTH-Konzentration sogar stärker war als bei einer höheren ACTH-Konzentration.

## 4 Diskussion

### 4.1 Modell

Wie in Kap. 3.1 beschrieben entsprach das charakterisierte Mausmodell nicht dem eigentlich vorgesehenen induzierbaren *knock-out* des MC2-R. Da es bei der homologen Rekombination nicht zu einem Ersatz des Wildtyp-MC2-R-Locus sondern zu einem zusätzlichen Einbau des Targeting Vectors ins Genom gekommen war, ergab sich statt des geplanten induzierbaren *knock-out* eine transgene Überexpression des MC2-R. Mögliche Mechanismen der fehlerhaften homologen Rekombination und Konsequenzen für die zukünftige Generierung von transgenen Tiermodellen mit loxP-flankierten Genabschnitten sowie die Eignung des verwendeten Tiermodells für Überexpressionsanalysen sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

#### 4.1.1 Gründe für die fehlerhafte homologe Rekombination

Voraussetzung für eine erfolgreiche homologe Rekombination ist ein hohes Maß an Übereinstimmung der eingebrachten und der genomischen DNA-Sequenz, sodass sich die Stränge über jeweils eine längere Sequenz am 5' und 3' Ende anlagern können. Optimal ist eine Homologie über 5-10kb. Der bei der hier beschriebenen Maus eingebrachte Vektor war 15,3kb lang, eine Homologie über einen ausreichen großen Bereich müsste also gegeben gewesen sein [83,142]. Liegt eine zu geringe Übereinstimmung vor, so kann es vorkommen, dass sich beide Stränge nur an einem Ende hybridisieren, wodurch es dann zu einer Insertion statt zu einer homologen Rekombination kommt [143]. Wie in Kap. 3.1 beschrieben, finden sich in der 5'-Region des TV viele repetitive DNA-Sequenzen, weswegen hier auch keine positionsspezifische Southern-Blot Sonde platziert werden konnte. Da solche Regionen sehr variabel sind [144], haben sich hier der TV und die genomische Sequenz möglicherweise zu stark voneinander unterschieden, sodass sich die beiden Stränge an dieser Stelle nicht angelagert haben. So resultierte wahrscheinlich statt einer homologen Rekombination eine Insertion des TV ins Genom [144].

#### 4.1.2 Alternative Methoden zur Überprüfung der homologen Rekombination

Die Selektion der embryonalen Stammzellen wurde u.a. durch die im TV enthaltene positive Neomycin-Genticin-Selektionskassette durchgeführt (s. Kap. 3.1). Dadurch wurden Zellen, die den TV trugen, unempfindlich gegen eine normalerweise toxische Substanz. Neben solchen positiven Selektionsmarkern existieren aber auch negative Selektionsmarker, mit welchen man eine fehlerhafte homologe Rekombination feststellen kann [143]. Bei diesem Verfahren wird

am Ende des TV eine Sequenz integriert, die für ein Enzym kodiert, welches eine nicht-toxische Substanz in eine toxische umwandelt. Bei einer korrekten homologen Rekombination wird der eingebrachte DNA-Strang in dieser Region durch das Restriktionsenzym geschnitten. Somit wird die entsprechende DNA-Region unvollständig ins Genom integriert und das Enzym nicht exprimiert. Funktioniert die homologe Rekombination nicht wie vorhergesehen und findet beispielsweise stattdessen eine Insertion statt, so ist die Sequenz noch im Ganzen vorhanden und das Enzym wird in der Zelle exprimiert. Wird jetzt eine Substanz zugegeben, die durch das Enzym verstoffwechselt - und dadurch toxisch - wird, so sterben diejenigen Zellen ab, bei denen die homologe Rekombination nicht richtig funktioniert hat. Diese Methode ist aber nicht sehr zuverlässig, weswegen es oft zur Selektion falsch-positiver Klone kommt [145]. Die Wahrscheinlichkeit dafür kann man verringern, indem man negative Selektionsmarker an beiden Enden des TV platziert. Eine absolut sichere Methode stellt dieses Verfahren aber trotzdem nicht dar, weswegen man auf weitere Screeningverfahren angewiesen ist, beispielsweise die Durchführung einer PCR oder eines Southern Blots am 3' sowie am 5' Ende.

Wie oben beschrieben, wurde nach Insertion des TV ins Genom ein Southern Blot zur Positionsbestimmung des TV durchgeführt. Allerdings wurde nur eine 3'-Sonde verwendet, da die Generierung einer 5'-Sonde nicht möglich gewesen war. Dieser Southern Blot zeigte das erwartete Ergebnis und es wurde nicht mit dem Einbau des TV hinter der Wildtyp-Sequenz gerechnet, daher wurden keine weiteren Tests bezüglich der Position des TV durchgeführt. Hätte man zu diesem Zeitpunkt schon mit einem Problem bei der homologen Rekombination gerechnet, wäre das im Folgenden beschriebene Screeningverfahren wahrscheinlich eine wirksame Methode gewesen, dies zu erkennen.

Ähnlich zur in Kap. 3.1 beschriebenen Methode zur Unterscheidung von MC2-R<sup>+loxP</sup>- und MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tieren gäbe es die Möglichkeit, embryonale Stammzellen nach der homologen Rekombination auf ihren Genotyp hin zu untersuchen. Dazu könnten dieselben Primer verwendet werden wie für die in Kap. 3.1 gezeigte qRT-PCR. Bei der Auswertung gäbe es drei Möglichkeiten (s. Abb. 4.1):

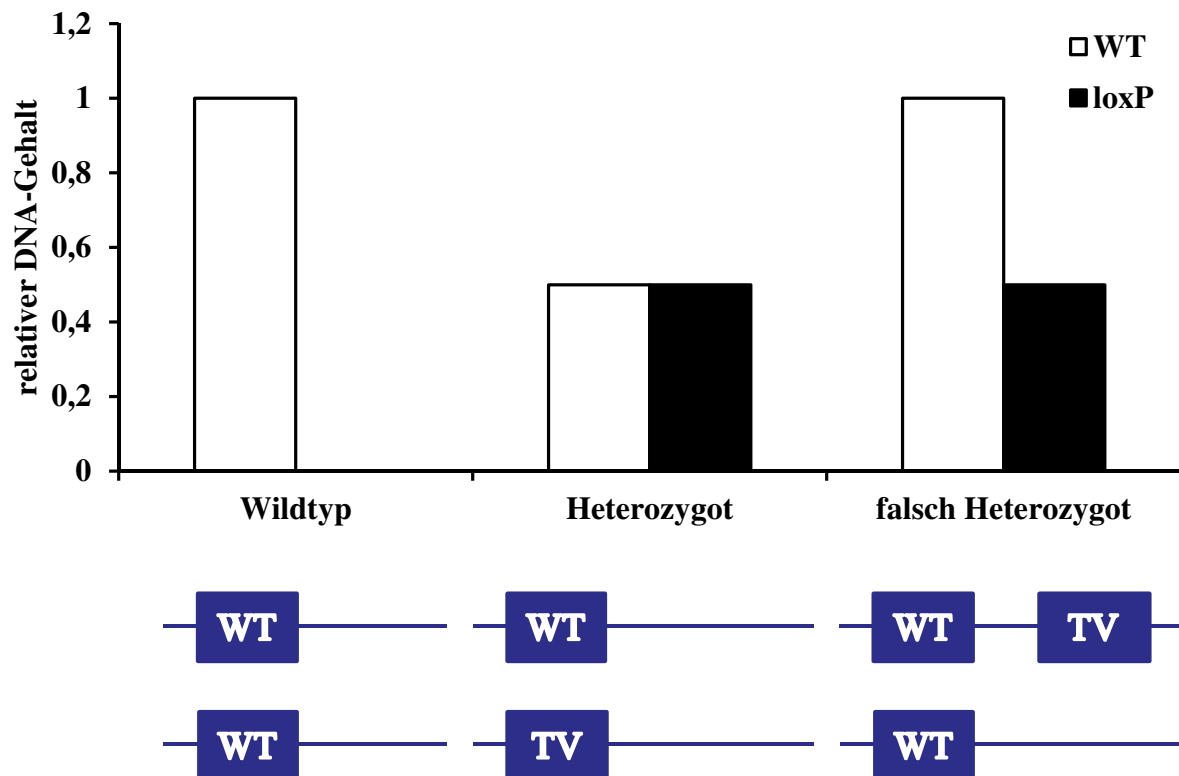
- (1) Wildtyp-Zellen zeigen kein loxP-Signal, da hier der TV nicht vorhanden ist.
- (2) Zellen, bei denen die homologe Rekombination richtig funktioniert hat, tragen auf einem Allel nur den loxP-flankierten MC2-R, auf dem anderen Allel nur den Wildtyp-MC2-R. Somit ist von beiden Varianten gleich viel DNA vorhanden, wodurch auch das ermittelte Signal beider qRT-PCRs gleich stark ausfällt (heterozygot). Der gleiche relative DNA-Gehalt würde auch in falsch-homozygoten Zellen, bei denen auf beiden Allelen der TV und die Wildtyp-DNA



vorhanden ist, vorliegen. Da es in einer Zelle nie zur homologen Rekombination auf beiden Allelen kommt, ist dieser Fall ausgeschlossen.

(3) Sollte die homologe Rekombination, wie im vorliegenden Mausmodell geschehen, nicht richtig funktioniert haben, wäre auf beiden Allelen der Wildtyp-MC2-R und auf einem Allel zusätzlich ein loxP-flankierter MC2-R vorhanden. Somit wäre das Wildtyp-Signal doppelt so stark wie das TV-Signal (falsch heterozygot).

Mit dieser Methode könnte man schnell und zuverlässig ausschließen, dass ausgewählte Zellen einen nicht gewünschten Genotyp aufweisen. Die folgende Abbildung zeigt, wie die Ergebnisse einer qRT-PCR aussehen könnten sowie die jeweilig zugehörigen Genotypen.



**Abb. 4.1: qRT-PCR zum Screening embryonaler Stammzellen**

### 4.1.3 Möglichkeiten und Grenzen des entstandenen Mausmodells

Wie mittels qRT-PCR gezeigt werden konnte, lagen bei homozygoten Mäusen des hier verwendeten Mausmodells im Genom vier statt zwei MC2-R-Kopien vor. Werden gezielt transgene Tiere für Überexpressionsanalysen generiert, liegt das Gen in der Regel mehrfach vor. Hier wird eine große Anzahl (100-1000) von Genkopien in die embryonalen Stammzellen eingebracht, wovon dann meist 2-5 Kopien in das Genom integrieren [80]. Dabei sind der Ort sowie die Anzahl der Integrationen nicht vorhersehbar. Die anschließende Expressionsstärke

des Gens hängt vor allem vom Ort der Integration ab. So können bestimmte Sequenzen, die vor dem Promotor des eingebrachten Gens liegen, die Aktivität desselben verringern oder auch verstärken [81]. Die alleinige Anwesenheit zusätzlicher Kopien eines Gens bedeutet nicht automatisch auch eine relevante Überexpression.

Beim Mausmodell dieser Arbeit wurde aufgrund der ursprünglichen Intention der TV nicht mit einem eigenen Promotor versehen. Wie in Kap. 3.2 beschrieben, war es nicht gelungen, den TV exakt zu lokalisieren, weshalb mögliche regulierende Promotoren nicht untersucht werden konnten. Allerdings können auch bei transgenen Tieren die Orte der Insertion nicht weiter bestimmt werden. Genau wie beim hier vorhandenen Mausmodell wird überprüft, ob die Expression des zu untersuchenden Gens zunimmt und anhand dessen entschieden, ob sich das Mausmodell für die geplanten Experimente eignet oder nicht.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, war die Expression des MC2-R *in vitro* und gewebsspezifisch auch teilweise *in vivo* erhöht. Man kann also davon ausgehen, dass die integrierten Kopien des Gens auch transkribiert wurden und zu einer erhöhten Expression führten. Somit war das generierte Mausmodell für MC2-R-Überexpressionsanalysen geeignet. Beobachtete Unterschiede zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Kontrollgruppe können daher auf eine MC2-R-Überexpression zurückgeführt werden.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Genexpression in den Nebennieren, Corticosteron- und ACTH-Produktion

Wie in Kap. 0 beschrieben, gab es in Nebennieren keine signifikanten Unterschiede zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Kontrollgruppe bezüglich der Genexpression des MC2-R und von Genen der Steroidhormonbiosynthese. Der wahrscheinlichste Grund hierfür liegt in Regulationsmechanismen, durch welche sich die Genexpression auf ein normales Niveau eingestellt hatte. Ein denkbarer Regelkreis würde in einer initial erhöhten MC2-R-Expression mit dadurch verstärkter ACTH-Wirkung und in Folge vermehrter Corticosteronproduktion bestehen, woraufhin die Expression des MC2-R herunter reguliert wurde. Auch eine posttranskriptionelle Regulation ist denkbar.

Der Corticosteronspiegel bei Mäusen differiert stark zwischen verschiedenen Mausstämmen. Gemeinsam ist ihnen allerdings, dass Weibchen allgemein höhere Corticosteronspiegel aufweisen als Männchen [146-148]. Der ACTH-Spiegel im Blut ist normalerweise bei Männchen und Weibchen vergleichbar [149,150]. Sowohl bei Corticosteron- als auch bei ACTH-Werten konnten auch beim hier verwendeten Mausmodell diese beschriebenen geschlechtsspezifischen Ergebnisse beobachtet werden (s. Abb. 3.11). Unterschiede zwischen

MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Kontrollgruppe gab es nicht; der fehlende Einfluss auf den Corticosteronspiegel und die unveränderte Genexpression im Nebennierengewebe unterstützen das Konzept einer kompensatorischen Regulation, wodurch sich trotz der doppelten Anlage des MC2-R im Genom *in vivo* kein Einfluss auf die Nebennierenfunktion nachweisen lies.

Dem gegenüber waren bei der Messung der Corticosteronproduktion *ex vivo* in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe basal erhöhte Werte ermittelt worden. Die Steigerung der Corticosteronproduktion durch ACTH-Stimulation war in dieser Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.10). Bezüglich der erhöhten Basalwerte in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe ist wahrscheinlich, dass die Expression des MC2-R herunter reguliert worden war, aber trotzdem kein absolutes Normalniveau erreicht wurde. Somit war hier mehr MC2-R vorhanden als in der Wildtyp-Gruppe, sodass der Corticosteron-Basalspiegel etwas höher lag.

Im Blut konnte der kleine Unterschied aber nicht detektiert werden. Für die weniger starke Steigerung der Hormonproduktion unter ACTH-Stimulation wäre ein Szenario möglich, in dem nicht nur die MC2-R-Expression, sondern auch die Expression der Enzyme der Steroidhormonbiosynthese kompensatorisch vermindert war, sodass nach ACTH-Stimulation weniger Enzyme für eine schnelle Mehrproduktion von Corticosteron zur Verfügung standen.

Die genannten Beobachtungen lassen zwei verschiedene Regulationssysteme in den Nebennieren vermuten. Zum einen scheint ein intrazellulärer Mechanismus zu bestehen, durch den eine überschießende Wirkung von ACTH auf die Steroidhormonbiosynthese verhindert wird. Dieser Mechanismus kann in einer verminderten Expression des MC2-R und von Hormonen der Steroidhormonbiosynthese bestehen. Daneben ist es wahrscheinlich, dass ein hypophysärer Regelkreis besteht, welcher *in vivo* eine übermäßige Corticosteronfreisetzung verhinderte. Fällt nach Entnahme der Nebennieren diese Regulation weg und werden die Primärkulturzellen anschließend *in vitro* mit ACTH stimuliert, so werden bei Wildtypzellen höhere Corticosteronwerte erreicht. Bei den Wildtypzellen war die intrazelluläre Kompensation im Vergleich zu MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen wahrscheinlich weniger stark ausgeprägt und somit hatte der Wegfall der hypophysären Regulation hier einen größeren Einfluss.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimenten schlussfolgern, dass *in vitro* die Corticosteronproduktion durch die vermehrte MC2-R-Anwesenheit gesteigert war, aktivierte Regulationsmechanismen aber größere Unterschiede verhinderten. In diesen Regulationsmechanismen ist auch der Grund für mangelnde Unterschiede bei den *in vivo*-Messungen zu suchen.

### 4.2.2 Analyse des subcutanen und viszeralen Fettgewebes

Bei der Genexpressionsmessung des MC2-R im subcutanen und viszeralen Fettgewebe (s. Kap. 3.4) fiel auf, dass bei Männchen der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe der MC2-R im subcutanen Fettgewebe mit 300% signifikant und im viszeralen Fettgewebe mit 150% überexprimiert war (s. Abb. 3.18). Bei Weibchen konnten bezüglich der MC2-R-Expression keine Unterschiede festgestellt werden.

Das Gewicht des subcutanen Fettgewebes war im Verhältnis zum Körpergewicht in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.14). Dies könnte durch eine vermehrte Lipolyse, aktiviert durch eine erhöhte MC2-R-Expression, erklärt werden. Es war allerdings keine Überexpression der Lipolyseenzyme HSL und ATGL nachweisbar. Denkbar wäre, dass posttranskriptionelle Unterschiede zur vermehrten Lipolyse beigetragen haben, die mittels qRT-PCR jedoch nicht detektiert werden konnten. Ebenso möglich ist, dass die Lipolyse schon vor der Messung der Genexpression stattgefunden hatte und somit später keine Überexpression mehr festzustellen war.

Bei der Analyse des subcutanen Fettgewebes war besonders bemerkenswert, dass bei den Männchen der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe die Expression des MC2-R erhöht war und außerdem die Adipozyten kleiner waren als in der Kontrollgruppe. Warum die Expression des MC2-R im weiblichen subcutanen Fettgewebe nicht erhöht war, konnte nicht geklärt werden. Bei Weibchen war allerdings die Adipozytengröße nicht verringert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass MC2-R-Expression und Adipozytengröße negativ miteinander korrelieren, eine vermehrte MC2-R-Anwesenheit also zu einer geringeren Adipozytengröße führen könnte. Da sowohl bei Weibchen als auch Männchen der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe das subcutane Fettgewebe leichter war als in der Wildtyp-Gruppe, ist es möglich, dass es zwei unterschiedliche Mechanismen gibt, die für das geringere Fettgewicht verantwortlich waren.

Bei Männchen waren die Adipozyten des subcutanen Fettgewebes kleiner und damit das gesamte Fettdepot leichter. Hier könnte der einfache Grund in einer vermehrten stattgehabten Lipolyse liegen, die jetzt infolge der geringen Fettmenge herunter reguliert worden ist. Hervorzuheben ist an dieser Stelle auch, dass bei Männchen im subcutanen Fettgewebe eine stärkere Expression des MC2-R nachgewiesen werden konnte als im viszeralen Fettgewebe, obwohl die übrigen untersuchten Gene in beiden Fettgewebstypen ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufwiesen.

Da die Adipozyten bei Weibchen nicht kleiner waren, das Fettgewebe aber leichter, muss das Fettdepot aus weniger Adipozyten bestanden haben. Betrachtet man die Ergebnisse der MEFs

(Kap. 3.5 und 4.2.3) und publizierte Daten, nach denen der MC2-R die Lipolyse und die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten steigert [144,151], wäre es möglich, dass sich mehr Zellen zu Adipozyten differenziert hatten, diese daraufhin aber vermehrt Lipolyse betrieben haben. Dies führte schlussendlich zur Apoptose und somit waren weniger Adipozyten zu finden. Bei Weibchen gab es bezüglich der Expressionsniveaus der Lipolyseenzyme und des MC2-R zwischen den verschiedenen Gruppen und Fettgeweben keinen bedeutenden Unterschied. Dies ist gut mit bereits stattgehabten, zum Messzeitpunkt nicht mehr nachweisbaren, Veränderungen des Fettgewebes in Einklang zu bringen.

Mangelnde Unterschiede bezüglich des Gewichtes des viszeralen Fettgewebes sind verwunderlich, da bekannt ist, dass beim Menschen viszerales Fettgewebe allgemein lipolytisch aktiver ist als subcutanes Fettgewebe [152]. Beim Menschen beruht die verstärkte Lipolyse darauf, dass viszerales Fett stärker auf lipolytische Stimuli durch Glukokortikoide sowie Noradrenalin anspricht und außerdem schwächer auf die antilipolytische Wirkung von Insulin reagiert [153]. Es gibt aber wesentliche Unterschiede zwischen humanem und murinem Fettgewebe. Der MC2-R wird nicht in menschlichen Adipozyten exprimiert sondern lediglich in mesenchymalen Stammzellen, welche sich dann zu Adipozyten differenzieren [154,155]. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses des MC2-R auf die Adipozytendifferenzierung unter dem Umstand, dass dieser auch beim Menschen während dieser Differenzierung exprimiert wird, ist hier auch beim Menschen ein Einfluss möglich. Darüber hinaus könnte der MC2-R im physiologischen Stoffwechsel des subcutanen Fettgewebes von Mäusen eine entscheidende Rolle spielen, weshalb hier eine Überexpression entsprechend große Wirkung zeigt.

Bisher publizierte Ergebnisse zum Einfluss des MC2-R auf murine Adipozyten wurden überwiegend an physiologisch weniger repräsentativen Zelllinien (3T3-L1) erhoben. In diesen veröffentlichten Arbeiten wurden Adipozyten, die aus 3T3 Zellen differenziert worden waren, verwendet. Bei 3T3-Zellen handelt es sich um eine häufig eingesetzte Zelllinie immortalisierter muriner Fibroblasten [156,157]. Die Übertragung der bei dieser Zelllinie beobachteten Effekte auf primäre Fibroblasten bzw. Adipozyten ist aufgrund der Veränderung der Zellen, die im Laufe der zahlreichen Zellpassagen stattfinden, naturgemäß schwierig. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Adipozyten genutzt, welche aus primären Fibroblasten differenziert worden waren. Dennoch lassen auch diese Ergebnisse nicht unbedingt auf *in vivo* Effekte schließen, weshalb auch die Auswirkungen einer MC2-R-Überexpression *in vivo* untersucht wurden. Die hier gemachten Beobachtungen, dass eine MC2-R-Überexpression *in vivo* zu geringeren Fettgewichten und kleineren Adipozyten führt, wurden bislang noch nicht gemacht.

Darüber hinaus konnten anhand der MEFs und daraus der differenzierten Adipozyten frühere an 3T3-L1-Zellen beobachtete Effekte des MC2-R auf Adipozyten bestätigt werden.

### 4.2.3 MEFs und daraus differenzierte Adipozyten

Bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten war zu beobachten, dass in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe wesentlich mehr Zellen zu Adipozyten differenzierten als in der Kontrollgruppe. Vorangegangene Experimente der Arbeitsgruppe Beuschlein haben gezeigt, dass durch einen *knock-down* des MC2-R in 3T3-L1-Zellen deren Fähigkeit zur Adipozyten-Differenzierung abnimmt, hier also ein spiegelbildliches Ergebnis wie bei den MC2-R überexprimierenden Zellen dieser Arbeit auftritt [20]. Die Beobachtung, dass der MC2-R einen wesentlichen Faktor in der Adipozytendifferenzierung darstellt, deckt sich auch mit anderen publizierten Daten [55]. Diese Ergebnisse wurden aber bislang nur an artifiziellen Zelllinien erhoben. Die Beobachtung, dass die Differenzierung auch bei primären Fibroblasten gesteigert wird, wurde bislang noch nicht beschrieben.

Weshalb der prozentuale Anteils des subcutanen Fettgewichts am Körpergewicht der Mäuse trotz der *in vitro* beobachteten besseren Adipozytendifferenzierung niedriger war, kann nicht abschließend beantwortet werden. Am wahrscheinlichsten scheint jedoch, dass die Lipolyseaktivität von Adipozyten ebenfalls erhöht war. Somit würde das vermehrt differenzierte Fettgewebe auch vermehrt abgebaut werden, wodurch das Gewicht der Fettdepots insgesamt abnimmt. Dies ist sehr gut mit den Genexpressions-Daten der *in vitro* Experimente in Einklang zu bringen (s. Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Bei der Genexpressionsanalyse der HSL zeigte sich, dass in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe die Expression unter Basalbedingungen höher war als in der Kontrollgruppe. Dies belegt, dass die doppelte Anzahl von Kopien des MC2-R im Genom auch funktionelle Auswirkungen hatte. Darüber hinaus war das Genexpressionsniveau in der Kontrollgruppe nach 6- und 48-stündiger ACTH-Stimulation genauso hoch wie jeweils in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe unter Basalbedingungen. In der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe stieg die Genexpression aber nach 6-stündiger ACTH-Stimulation nicht weiter an. Man kann schließen, dass durch eine vermehrte MC2-R-Anwesenheit die HSL-Expression bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen im gleichen Maß erhöht wurde wie bei Wildtypzellen durch ACTH-Stimulation. Dass die Expressionsstärke bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Zellen unter Stimulation nicht weiter anstieg könnte mit einer bereits maximal stimulierten Situation erklärt werden, in der die Expression nicht weiter gesteigert werden konnte. Alternativ wären hier auch beginnende Regulationsmechanismen denkbar. Dass die Genexpression nach 48-stündiger ACTH-Stimulation wieder sinkt, legt das Vorhandensein einer Gegenregulation nahe und unterstützt die Ergebnisse der unveränderten

Corticosteronspiegel und Genexpression sowohl in der Nebenniere als auch im Fettgewebe *in vivo* der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tiere.

Die beobachtete Assoziation der HSL-Expression und damit der Lipolyse mit der MC2-R-vermittelten ACTH-Stimulation bestätigt somit publizierte Daten, wonach die lipolytische Aktivität von Adipozyten MC2-R-vermittelt gesteigert wird [53,54]. Die erhobenen Daten decken sich auch mit Vorergebnissen der Arbeitsgruppe Beuschlein, nach welchen die HSL-Expression in Adipozyten sinkt, wenn ein *knock-down* des MC2-R durchgeführt wird [20]. Auch andere publizierte Daten legen eine Steigerung der HSL-Expression durch eine MC2-R-Aktivierung nahe, was durch diese Arbeit und durch andere Ergebnissen der Arbeitsgruppe Beuschlein bestätigt werden kann [158]. Es konnten beim Gewicht des subcutanen Fettgewebes Unterschiede zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden, nicht hingegen beim viszeralen Fettgewebe. Daher scheint es, als wäre der lipolytische Effekt des MC2-R vor allem im subcutanen Fettgewebe vorhanden.

Wie die Daten der Glycerolmessung nach zweistündiger ACTH-Stimulation zeigen (s. Abb. 3.24), wurde nicht nur die Genexpression der HSL sondern auch die Lipolyse-Aktivität der Adipozyten durch ACTH-Stimulation gesteigert. Es war allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>- und Kontrollgruppe erkennbar, ebenso konnte die Lipolyse in denselben Gruppen durch eine höhere ACTH-Konzentration nicht weiter gesteigert werden. Die lipolytische Wirkung von ACTH scheint ein Maximalniveau zu erreichen, das nicht überschritten werden kann. Somit ist durch eine vermehrte MC2-R-Anwesenheit oder höhere ACTH-Konzentrationen keine Steigerung mehr möglich. Dass der ACTH-abhängige Effekt auf die Lipolyse ein Maximalniveau erreicht, wurde schon in publizierten *in vitro* Daten postuliert [53]. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen damit andere publizierte *in vitro* Daten, nach denen der MC2-R eine essentielle Rolle in der Lipolyse spielt [20,43]. Die Lipolyse wurde durch Noradrenalin in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe tendenziell stärker aktiviert als in der Kontrollgruppe (p=0,058). Zusammen mit publizierten Daten ergeben sich damit Hinweise darauf, dass eine vermehrte MC2-R-Anwesenheit zu einer verstärkten Noradrenalin-induzierten Lipolyse führt, der MC2-R eine verstärkende Wirkung auf die Noradrenalin-vermittelte Lipolyse hat. Die gleichen Tendenzen der Expressionsmuster wie bei der HSL fanden sich bei den anderen untersuchten Genen aP2, Perilipin und PPAR $\gamma$ 2.

aP2 (auch als FABP-4 bezeichnet) wird in Adipozyten exprimiert und ist ein Protein, welches intrazellulär FFAs transportiert [159]. Es wurde beschrieben, dass es in der Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten eine wichtige Rolle spielt, was sich mit den Ergebnissen dieser

Arbeit deckt, da es in den besser differenzierten MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Adipozyten stärker exprimiert wurde als in der Kontrollgruppe [160].

Besonders bemerkenswert ist, dass der MC2-R bei der Adipozytendifferenzierung relevant ist, was sich auch mit oben erwähnten Ergebnissen eines MC2-R *knock-down* spiegelbildlich ergänzt [20]. Da durch ACTH-Stimulation die Expression des aP2 gesteigert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass dies MC2-R-abhängig erfolgt und somit das aP2 in der Expressionskaskade unterhalb des MC2-R angesiedelt ist. Es wurde gezeigt, dass aP2 in der Lipolyse eine wichtige Rolle spielt und darüber hinaus scheint es die Expression anderer Enzyme der Lipolyse zu verstärken [161]. Auch diese Beobachtungen decken sich gut mit Ergebnissen dieser Arbeit, nach denen sich die Expression der HSL parallel zu der des aP2 verhält.

Perilipin ist ein Adipozyten-umgebendes Protein, welches Adipozyten vor dem Zugriff durch die HSL und somit vor der Lipolyse schützt [162]. Perilipin wird erst von differenzierten Adipozyten exprimiert, nicht jedoch während der Differenzierung. Dadurch ist belegt, dass es sich bei den untersuchten Perilipin exprimierenden Zellen neben Fibroblasten um von diesen abgeleitete, ausdifferenzierte Adipozyten handelt [162]. Da Perilipin Adipozyten vor der HSL-abhängigen Lipolyse schützt, stellt sich die Frage, warum seine Expression unter ACTH-Stimulation bzw. MC2-R-Überexpression zunimmt, wo doch der MC2-R eine lipolytische Wirkung haben soll. Hierfür sind mehrere Erklärungen denkbar: erstere wäre, dass der MC2-R die Expression einer Reihe von Adipozyten-spezifischen Proteinen und Enzymen steigert, darunter auch Perilipin. Eine weitere Möglichkeit liegt wiederum in aktivierten Regulationsmechanismen, die einen übermäßigen Abbau des Fettgewebes verhindern sollen. Außerdem wäre es denkbar, dass die stärkere Perilipin-Expression in der MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Gruppe durch die größere Anzahl an vorhandenen Adipozyten bedingt war, der Basalwert pro Adipozyt also nicht erhöht war. Die steigende Perilipin-Expression unter MC2-R-Stimulation muss allerdings mit einer der beiden ersten Möglichkeiten erklärt werden, da bei der Quantifizierung der Perilipin-Expression im Anschluss an die Stimulation der höhere Ausgangslevel berücksichtigt worden ist.

PPAR $\gamma$ 2 reguliert die Fettaufnahme in Adipozyten und deren Differenzierung. Hier dient PPAR $\gamma$ 2 als Transkriptionsfaktor, indem es in verschiedenen Promotorregionen bindet und dadurch die Expression der entsprechenden Gene fördert [163,164]. Es wird vermutet, dass die Expression des MC2-R durch PPAR $\gamma$ 2 gesteigert werden soll, indem ein *CCAAT-Enhancer* auf dem Genom aktiviert wird [55,56]. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge wird aber auch die Expression des PPAR $\gamma$ 2 durch eine ACTH-Stimulation und damit durch den MC2-R gefördert.



Dieses Faktum legt abermals den Schluss nahe, dass der MC2-R eine wichtige Rolle in der Adipozytendifferenzierung und im Fettstoffwechsel spielt, da eben diese Funktionen auch über den PPAR $\gamma$ 2 vermittelt werden. Es gibt Ergebnisse der Arbeitsgruppe Beuschlein, bei welchen wiederum durch einen MC2-R *knock-down* die PPAR $\gamma$ 2-Expression gesenkt werden konnte. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung eines bisher unbekannten fördernden Einflusses des MC2-R auf die PPAR $\gamma$ 2-Expression [20].

### 5 Zusammenfassung

Der MC2-R bindet spezifisch ACTH und wird vor allem in der Nebenniere exprimiert. Hier führt seine Aktivierung im Rahmen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zu einer Steigerung der Glukokortikoidproduktion. Daneben wird der MC2-R auch in weiteren Geweben wie beispielsweise dem weißen Fettgewebe exprimiert, allerdings ist hier über seine funktionelle Bedeutung bislang nur wenig bekannt.

Es wurde gezeigt, dass eine ACTH-Stimulation *in vitro* zu einer Steigerung der Lipolyse führt. Darüber hinaus scheint es auch *in vivo* einen Zusammenhang zwischen ACTH-Spiegel und Lipolyseaktivität zu geben, da bei adipösen Personen erhöhte ACTH-Konzentrationen im Blut nachgewiesen wurden, welche durch eine pharmakologische Inhibition der Lipolyse und damit Senkung des FFA-Spiegels normalisiert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte bei gesunden Personen die ACTH-Konzentration im Blut durch Injektion von FFA gesenkt werden. Die genauen Wirkungen von ACTH bzw. des MC2-R auf das Fettgewebe sowie etwaige vorhandene Regelkreise konnten damit bislang nicht geklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktion des MC2-R im Fettgewebe am Mausmodell *in vivo* sowie in aus primären Fibroblasten differenzierten murinen Adipozyten. MC2-R überexprimierende Mäuse (MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>) wiesen im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant niedrigere subcutane Fettgewichte auf. Darüber hinaus waren die Adipozyten des subcutanen Fettgewebes bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Männchen morphologisch signifikant kleiner. Somit kann eine negative Korrelation zwischen MC2-R-Expression und subcutanem Fettgewicht und Adipozytengröße postuliert werden.

Bei *in vitro* Untersuchungen differenzierten sich MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten vermehrt zu Adipozyten und wiesen eine höhere Lipidakkumulation auf. Es kann daher eine Förderung der Adipozytendifferenzierung durch den MC2-R angenommen werden.

Differenzierte MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Adipozyten zeigten basal gleiche Expressionsniveaus der Enzyme Perilipin, aP2, HSL und PPAR $\gamma$ 2 wie Wildtyp-Adipozyten nach ACTH-Stimulation. Allerdings war bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Adipozyten im Gegensatz zu Wildtyp-Adipozyten durch ACTH-Stimulation keine weitere Expressionssteigerung mehr möglich. Die Expression scheint aufgrund aktivierter Regulationsmechanismen ein Maximalniveau zu erreichen. Diese Ergebnisse stützen die These einer wichtigen Rolle des MC2-R im Fettstoffwechsel, bei der Stimulation der Adipozytendifferenzierung sowie bei der Lipolyse.

Differenzierte Adipozyten zeigten nach Stimulation mit ACTH und damit MC2-R-Aktivierung eine signifikante Zunahme der Lipolyseaktivität. Eine Förderung der Lipolyse durch den

MC2-R wurde bereits beschrieben, wobei in diesen Arbeiten allerdings artifizielle Zelllinien verwendet wurden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse erstmals an Adipozyten, die aus embryonalen Fibroblasten generierten worden sind, bestätigt werden.

Zusammenfassend hatte der MC2-R im hier verwendeten Modell *in vitro* einen fördernden Einfluss auf Adipozytendifferenzierung und Lipolyseaktivität. Die gezeigte Genexpressionssteigerung von Enzymen der Adipozytendifferenzierung und der Lipolyse bei MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Adipozyten stützen dieses Konzept. *In vivo* zeigten sich bei MC2-R überexprimierenden Mäusen erniedrigte subcutane Fettgewichte und geringere Adipozytengrößen bei männlichen MC2-R<sup>loxP/loxP</sup>-Tieren. Somit hat der MC2-R auch *in vivo* einen wichtigen Einfluss auf das Fettgewebe, welcher wahrscheinlich über eine gesteigerte Lipolyse vermittelt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen einen relevanten funktionellen Einfluss des MC2-R auf das Fettgewebe und seine Differenzierung nahe und können weiter zum Verständnis der Rolle des MC2-R im Fettstoffwechsel beitragen. Die Bedeutung des MC2-R im Rahmen des physiologischen und pathologischen Fettstoffwechsels beim Menschen ist aber weiterhin nicht abschließend geklärt und sollte weiter untersucht werden.

## 6 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
a.d.	aqua destillata
aP2	adipocyte protein 2
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
BMI	body mass index
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
CLIP	corticotropin-like intermediate peptide
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
DAG	Diacylglycerid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FABP4	fatty acid binding protein 4
FFA	free fatty acids
FBS	Fetal Bovine Serum
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

---

HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHNR	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
kb	Kilobasen
KHK	koronare Herzkrankheit
MAG	Monoacyglycerid
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
MGL	Monoacylglyceridlipase
MMLV	Moloney Murines Leukämievirus
mRNA	Messenger RNA
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
mt	Mutant
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NNR	Nebennierenrinde
p.c.	post coitatem
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate-buffered saline
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
P/S	Penicillin/Streptomycin
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

---

RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
scc	Cholesterol side-chain cleavage enzyme
SEM	Standard error of mean
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
Tab	Tabelle
TAG	Triacylglyceride
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan
TV	Targeting Vector
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kurth BM, Schaffrath Rosario A. Die Verbreitung von +ßbergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2007; **50**: 736-743.
2. Statistisches Bundesamt. Mikrozensus - Fragen zur Gesundheit 2009. 2010.
3. Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *British Medical Journal* 2001; **322**: 716-720.
4. Lean MEJ, Han TS, Morrison CE. Waist Circumference As A Measure for Indicating Need for Weight Management. *British Medical Journal* 1995; **311**: 158-161.
5. Statistisches Bundesamt. Todesursachen 2010. 2010.
6. Lenz M, Richter T, Mühlhauser I. Morbidität und Mortalität bei Übergewicht und Adipositas im Erwachsenenalter. *Dtsch Arztebl Int* 2009 2009; **106(40)**: 641-648.
7. Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiology of aging* 2005; **26 Suppl 1**: 11-16.
8. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutrition* 2004; **7**: 245-250.
9. Knoll KP, Hauner H. Kosten der Adipositas in der Bundesrepublik Deutschland - Eine aktuelle Krankheitskostenstudie. *Adipositas - Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie* 2008; **2**: 204-210.
10. Heymsfield SB, van Mierlo CAJ, van der Knaap HCM, Heo M, Frier HI. Weight management using a meal replacement strategy: meta and pooling analysis from six studies. *International Journal of Obesity* 2003; **27**: 537-549.
11. Anderson JW, Konz EC. Obesity and disease management: Effects of weight loss on comorbid conditions. *Obesity Research* 2001; **9**: 326S-334S.
12. Toubro S, Astrup A. Randomised comparison of diets for maintaining obese subjects' weight after major weight loss: Ad lib, low fat, high carbohydrate diet v fixed energy intake. *British Medical Journal* 1997; **314**: 29-34.
13. Jakicic JM, Clark K, Coleman E, Donnelly JE, Foreyt J, Melanson E, Volek J, Volpe SL. Appropriate strategies for intervention weight loss and prevention of weight regain for adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2001; **33**: 2145-2156.
14. Jeffery RW, Drewnowski A, Epstein LH, Stunkard AJ, Wilson GT, Wing RR, Hill DR. Long-term maintenance of weight loss: Current status. *Health Psychology* 2000; **19**: 5-16.
15. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjostrom CD, Sullivan M, Wedel H. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *New England Journal of Medicine* 2004; **351**: 2683-2693.

16. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatric surgery: A systematic review and meta-analysis. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2004; **292**: 1724-1737.
17. Sjostrom L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M, Golay A, Koppeschaar HPF, Krempf M. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Lancet* 1998; **352**: 167-172.
18. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. 01/10 Sibutramin-haltige Arzneimittel: EMA empfiehlt das Ruhen der Zulassungen. 2010.
19. James W, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, Torp-Pedersen C, Sharma AM, Shepherd GM, Rode RA, Renz CL. Effect of Sibutramine on Cardiovascular Outcomes in Overweight and Obese Subjects. *New England Journal of Medicine* 2010; **363**: 905-917.
20. Betz M, Hatiboglu N, Mauracher B, Hadaschik D, Sauter A, Demmelmair H, Koletzko B, Beuschlein F, Slawik M. Mc2 Receptor Knockdown Modulates Differentiation and Lipid Composition in Adipocytes. *Hormone and Metabolic Research* 2012; **44**: 670-675.
21. Virtue S, Vidal-Puig A. It's Not How Fat You Are, It's What You Do with It That Counts. *Plos Biology* 2008; **6**: 1819-1823.
22. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; **453**: 783-787.
23. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 2008; **134**: 933-944.
24. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R. Lipolysis: pathway under construction. *Current Opinion in Lipidology* 2005; **16**: 333-340.
25. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annual Review of Nutrition* 2000; **20**: 365-+.
26. Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase - Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 27218-27223.
27. Löffler G, Petrides E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 2012.
28. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; **365**: 1333-1346.
29. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiological Reviews* 2007; **87**: 507-520.
30. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M,



- Hoefler G, Zechner R. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006; **312**: 734-737.
31. Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliott C, Boiani R, Campbell M, Christodoulides C, Perrin C, Jimenez-Linan M, Blount M, Dixon J, Zahn D, Thresher RR, Aparicio S, Carlton M, Colledge WH, Kettunen MI, Seppanen-Laakso T, Sethi JK, O'Rahilly S, Brindle K, Cinti S, Oresic M, Burcelin R, Vidal-Puig A. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 isoform. *Diabetes* 2005; **54**: 1706-1716.
32. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis R, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *Plos Genetics* 2007; **3**.
33. Slawik M, Vidal-Puig AJ. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Research Reviews* 2006; **5**: 144-164.
34. Slawik M, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes and Nutrition* 2007; **2**: 41-45.
35. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology* 2003; **14**: 281-287.
36. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N, Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hastay AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H, Osuga J, Yamada N. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 2007; **13**: 1193-1202.
37. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001; **104**: 531-543.
38. Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchetmackie EJ, Londos C. Perilipin, A Major Hormonally Regulated Adipocyte-Specific Phosphoprotein Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets. *Journal of Biological Chemistry* 1991; **266**: 11341-11346.
39. Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, Pfluger PT, Castaneda TR, Neschen S, Hofmann SM, Howles PN, Morgan DA, Benoit SC, Szanto I, Schrott B, Schuermann A, Joost HG, Hammond C, Hui DY, Woods SC, Rahmouni K, Butler AA, Farooqi I, O'Rahilly S, Rohner-Jeanrenaud F, Tschoep MH. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 2007; **117**: 3475-3488.
40. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; **6**: 463-475.
41. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: An old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004; **25**: 132-149.

42. Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 2006; **147**: 1664-1674.
43. Seidah NG, Rochemont J, Hamelin J, Lis M, Chretien M. Primary Structure of the Major Human Pituitary Pro-Opiomelanocortin Nh2-Terminal Glycopeptide - Evidence for An Aldosterone-Stimulating Activity. *Journal of Biological Chemistry* 1981; **256**: 7977-7984.
44. Sayers G. The Adrenal Cortex and Homeostasis. *Physiological Reviews* 1950; **30**: 241-320.
45. Parker KL, Schimmer BP. Genetics of the development and function of the adrenal cortex. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2001; **2**: 245-252.
46. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. Minireview: Transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 2005; **146**: 1018-1024.
47. Palacios R, Sugawara I. Hydrocortisone Abrogates Proliferation of T-Cells in Autologous Mixed Lymphocyte-Reaction by Rendering the Interleukin-2 Producer T-Cells Unresponsive to Interleukin-1 and Unable to Synthesize the T-Cell Growth-Factor. *Scandinavian Journal of Immunology* 1982; **15**: 25-31.
48. Plotsky PM, Otto S, Sapolsky RM. Inhibition of Immunoreactive Corticotropin-Releasing Factor Secretion Into the Hypophyseal-Portal Circulation by Delayed Glucocorticoid Feedback. *Endocrinology* 1986; **119**: 1126-1130.
49. Voisey J, Carroll L, van Daal A. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Current Drug Targets* 2003; **4**: 586-597.
50. Boston BA. *The role of melanocortins in adipocyte function*. 1999.
51. Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *European Journal of Endocrinology* 2001; **144**: 199-206.
52. Boston BA. The role of melanocortins in adipocyte function. *Annals of the New York Academy of Sciences; Cutaneous neuroimmunomodulation: The proopiomelanocortin system* 1999; **885**: 75-84.
53. Kelly KL, Wong EHA, Jarett L. Adrenocorticotrophic Stimulation and Insulin-Inhibition of Adipocyte Phospholipid Methylation. *Journal of Biological Chemistry* 1985; **260**: 3640-3644.
54. White JE, Engel FL. Lipolytic Action of Corticotropin on Rat Adipose Tissue In vitro. *Journal of Clinical Investigation* 1958; **37**: 1556-1563.
55. Noon LA, Clark AJL, Peter JK. A peroxisome proliferator-response element in the murine mc2-r promoter regulates its transcriptional activation during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**: 22803-22808.
56. Noon LA, Clark AJ, O'Shaughnessy PJ, King PJ. A CCAAT/enhancer-binding protein site at -87 is required for the activation of a novel murine melanocortin 2-receptor promoter at late stages during adipogenesis. *Endocrinology* 2006; **147**: 6019-6026.

57. Jimenez M, Leger B, Canola K, Lehr L, Arboit P, Seydoux J, Russell AP, Giacobino JP, Muzzin P, Preitner F. beta(1)/beta(2)/beta(3)-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *Febs Letters* 2002; **530**: 37-40.
58. Kok P, Kok SW, Buijs MM, Westenberg JJM, Roelfsema F, Frolich M, Stokkel MPM, Meinders AE, Pijl H. Enhanced circadian ACTH release in obese premenopausal women: reversal by short-term acipimox treatment. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2004; **287**: E848-E856.
59. Lanfranco F, Giordano R, Pellegrino M, Gianotti L, Ramunni J, Picu A, Baldi M, Ghigo E, Arvat E. Free fatty acids exert an inhibitory effect on adrenocorticotropin and cortisol secretion in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; **89**: 1385-1390.
60. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; **89**: 2548-2556.
61. Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homolog. *Nature* 1994; **372**: 425-432.
62. Williams KW, Scott MM, Elmquist JK. From observation to experimentation: leptin action in the mediobasal hypothalamus. *American Journal of Clinical Nutrition* 2009; **89**: 985S-990S.
63. Brennan AM, Mantzoros CS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology - emerging clinical applications. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2006; **2**: 318-327.
64. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, Mckee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 1996; **334**: 292-295.
65. de Salles B, Simao R, Fleck S, Dias I, Kraemer-Aguiar L, Bouskela E. Effects of Resistance Training on Cytokines. *International Journal of Sports Medicine* 2010; **31**: 441-450.
66. Knutson KL, Spiegel K, Penev P, Van Cauter E. The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews* 2007; **11**: 163-178.
67. Dubuc GR, Phinney SD, Stern JS, Havel PJ. Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism-Clinical and Experimental* 1998; **47**: 429-434.
68. Harikai N, Hashimoto A, Semma M, Ichikawa A. Characteristics of lipolysis in white adipose tissues of SHR/NDmc-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2007; **56**: 847-855.
69. Norman D, Isidori AM, Frajese V, Caprio M, Chew SL, Grossman AB, Clark AJ, Besser GM, Fabbri A. ACTH and alpha-MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; **200**: 99-109.

70. Renz M, Tomlinson E, Hultgren B, Levin N, Gu QM, Shimkets RA, Lewin DA, Stewart TA. Quantitative expression analysis of genes regulated by both obesity and leptin reveals a regulatory loop between leptin and pituitary-derived ACTH. *Journal of Biological Chemistry* 2000; **275**: 10429-10436.
71. Spinedi E, Gaillard RC. A regulators loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: A physiological role of ACTH. *Endocrinology* 1998; **139**: 4016-4020.
72. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS, Gold PW. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Medicine* 1997; **3**: 575-579.
73. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu DQ, Lowell B, MaratosFlier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; **382**: 250-252.
74. Renz M, Tomlinson E, Hultgren B, Levin N, Gu QM, Shimkets RA, Lewin DA, Stewart TA. Quantitative expression analysis of genes regulated by both obesity and leptin reveals a regulatory loop between leptin and pituitary-derived ACTH. *Journal of Biological Chemistry* 2000; **275**: 10429-10436.
75. Raber J, Chen SZ, Mucke L, Feng LL. Corticotropin-releasing factor and adrenocorticotrophic hormone as potential central mediators of OB effects. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 15057-15060.
76. Crow JF, Dove WF. Perspective - Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics - C. C. Little, Cancer and inbred mice. *Genetics* 2002; **161**: 1357-1361.
77. Snell GD, Reed S. Castle, William, Ernest Pioneer Mammalian Geneticist. *Genetics* 1993; **133**: 751-753.
78. Sparrow S. The Nude-Mouse in Experimental and Clinical Research, Vol 2 - Fogh, J, Giovanella, Bc. *Quarterly Review of Biology* 1983; **58**: 305-306.
79. Formby B, Miller N, Charles MA. Role of Cd4 T Cells Bearing Receptors Encoded by V-Beta-8 Gene Segments in the Immunopathogenesis of the Nod Mouse. *Diabetologia* 1990; **33**: A62.
80. Wehner R, Gehring W, Kühn A. *Zoologie*. Thieme, Stuttgart, 2007.
81. Hammes A, Schedl A. Generation of transgenic mice from plasmids, BACs and YACs. In: Jackson IJ, Abbott CM, eds. *Mouse Genetics and Transgenics*. Oxford University Press, 2000: 217-245.
82. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic-Transformation of Mouse Embryos by Micro-Injection of Purified Dna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1980; **77**: 7380-7384.
83. Thomas KR, Capecchi MR. Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem-Cells. *Cell* 1987; **51**: 503-512.

84. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, Mearthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice Deficient for P53 Are Developmentally Normal But Susceptible to Spontaneous Tumors. *Nature* 1992; **356**: 215-221.
85. Pinkert C. *Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook*. Academic Press, 2002.
86. Davies J, Jimenez A. A New Selective Agent for Eukaryotic Cloning Vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1980; **29**: 1089-1092.
87. Southern PJ, Berg P. Transformation of Mammalian Cells to Antibiotic Resistance with A Bacterial Gene Under Control of the Sv-40 Early Region Promoter. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1982; **1**: 327-342.
88. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective Hematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth-Factor-Beta-1 Knock Out Mice. *Development* 1995; **121**: 1845-1854.
89. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible Gene Targeting in Mice. *Science* 1995; **269**: 1427-1429.
90. Gu H, Zou YR, Rajewsky K. Independent Control of Immunoglobulin Switch Recombination at Individual Switch Regions Evidenced Through Cre-Ioxp-Mediated Gene Targeting. *Cell* 1993; **73**: 1155-1164.
91. Sauer B, Henderson N. Site-Specific Dna Recombination in Mammalian-Cells by the Cre Recombinase of Bacteriophage-P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; **85**: 5166-5170.
92. Sauer B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods-A Companion to Methods in Enzymology* 1998; **14**: 381-392.
93. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of A Dna-Polymerase-Beta Gene Segment in T-Cells Using Cell-Type-Specific Gene Targeting. *Science* 1994; **265**: 103-106.
94. Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews Genetics* 2001; **2**: 743-755.
95. Hoess RH, Abremski K. Interaction of the Bacteriophage-P1 Recombinase Cre with the Recombining Site Loxp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1984; **81**: 1026-1029.
96. Nagy A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000; **26**: 99-109.
97. Hunt CR, Ro JHS, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM. Adipocyte P2 Gene - Developmental Expression and Homology of 5'-Flanking Sequences Among Fat Cell-Specific Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; **83**: 3786-3790.
98. Rolph MS, Young TR, Shum BO, V, Gorgun CZ, Schmitz-Peiffer C, Ramshaw IA, Hotamisligil GS, Mackay CR. Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein aP2. *Journal of Immunology* 2006; **177**: 7794-7801.

99. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry* 1996; **271**: 10697-10703.
100. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A Novel Serum-Protein Similar to C1Q, Produced Exclusively in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1995; **270**: 26746-26749.
101. Wang ZV, Deng Y, Wang QA, Sun K, Scherer PE. Identification and Characterization of a Promoter Cassette Conferring Adipocyte-Specific Gene Expression. *Endocrinology* 2010; **151**: 2933-2939.
102. Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F, Schutz G. Regulation of cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Research* 1996; **24**: 1404-1411.
103. Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; **93**: 10887-10890.
104. Logie C, Stewart AF. Ligand-Regulated Site-Specific Recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; **92**: 5940-5944.
105. Jordan VC. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *British Journal of Pharmacology* 2006; **147**: S269-S276.
106. Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nature Genetics* 2000; **25**: 139-140.
107. Dymecki SM. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; **93**: 6191-6196.
108. Reisch N, Slawik M, Zwermann O, Beuschlein F, Reincke M. Genetic influence of an ACTH receptor promoter polymorphism on adrenal androgen secretion. *European Journal of Endocrinology* 2005; **153**: 711-715.
109. Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2001.
110. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-Directed Enzymatic Amplification of Dna with A Thermostable Dna-Polymerase. *Science* 1988; **239**: 487-491.
111. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic-Acid Polymerase from Extreme Thermophile *Thermus-Aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 1976; **127**: 1550-1557.
112. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter Avanesyan MD, Kushnirov VV. Yeast [PSI<sup>+</sup>] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**: 49636-49643.
113. Robyt JF, White BJ. *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. 1990.

114. Lewis M. Agarose gel electrophoresis (basic method).  
<http://www.methodbook.net/index.html> . 2001.
115. New England Biolabs. Material Safety Data Sheet NEB# B7021. 2011.
116. Promega Corporation. SV Total RNA Isolation System Technical Manual. 2010.
117. Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; **162**: 156-159.
118. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. 2008.
119. Mehta A. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy – Principle.  
<http://pharmaxchange.info/press/2011/12/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy-principle/> . 2011.
120. Matter L. *Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der Spektrometrie*. 1995.
121. Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. 2012.
122. Promega Corporation. Material Safety Data Sheet acc. to ISO/DIS 11014. 2011.
123. Stevens A. Ribonucleic Acids - Biosynthesis and Degradation. *Annual Review of Biochemistry* 1963; **32**: 15-&.
124. Roth MJ, Tanese N, Goff SP. Purification and Characterization of Murine Retroviral Reverse-Transcriptase Expressed in Escherichia-Coli. *Journal of Biological Chemistry* 1985; **260**: 9326-9335.
125. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; **6**: 986-994.
126. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie unserer Zeit* 2007; **37**: 120-126.
127. Bio-Rad Laboratories. Sso Fast EvaGreen Supermix. 2012.
128. Stratagene. MxPro QPCR Software Instruction Manual. 2009.
129. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; **29**.
130. Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart CL. Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines. *Guide to Techniques in Mouse Development* 1993; **225**: 803-823.
131. Joyner AL. *Gene Targeting: A Practical Approach*. 2000.
132. Sigma-Aldrich. Material Safety Data Sheet Free Glycerol Reagent (F642).  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/DisplayMSDSContent.do> . 2012.
133. Carl Roth GmbH. Operation Manual Roti-Quant universal.  
[http://www.carlroth.com/media/\\_en-com/usage/0120.pdf](http://www.carlroth.com/media/_en-com/usage/0120.pdf) . 2011.

134. Avwioro G. HISTOCHEMICAL USES OF HAEMATOXYLIN - A REVIEW. *JPCS* 2011; **1**: 24-34.
135. IDS GmbH. Corticosterone EIA.  
<http://www.intermedico.com/userfiles/file/products/chemistry/IDS/Corticosterone%20Brochure.pdf> . 2009.
136. Biomerica. Material Safety Data Sheet ACTH ELISA Kit.  
[http://www.biomerica.com/product\\_files/ProdID\\_42\\_FileID\\_717.pdf](http://www.biomerica.com/product_files/ProdID_42_FileID_717.pdf) . 2011.
137. Hendrickson WA, Pahler A, Smith JL, Satow Y, Merritt EA, Phizackerley RP. Crystal-Structure of Core Streptavidin Determined from Multiwavelength Anomalous Diffraction of Synchrotron Radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; **86**: 2190-2194.
138. Acharya A, Baek ST, Banfi S, Eskiocak B, Tallquist MD. Efficient Inducible Cre-Mediated Recombination in Tcf21 Cell Lineages in the Heart and Kidney. *Genesis* 2011; **49**: 870-877.
139. Elbrecht A, Chen YL, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz MD, Moller DE, Berger J. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; **224**: 431-437.
140. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, VidalPuig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 18779-18789.
141. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2000; **46**: 69-81.
142. Hasty P, Riveraperez J, Bradley A. The Length of Homology Required for Gene Targeting in Embryonic Stem-Cells. *Molecular and Cellular Biology* 1991; **11**: 5586-5591.
143. Schenkel J. Vektoren. *Transgene Tiere*. Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
144. Singer MF. Sines and Lines - Highly Repeated Short and Long Interspersed Sequences in Mammalian Genomes. *Cell* 1982; **28**: 433-434.
145. Joyner A. *Gene Targeting: A Practical Approach*. Oxford University Press, 2000.
146. DRG Diagnostics. Corticosterone (Rat/Mouse) ELISA. 2011.
147. Grad B, Khalid R. Circulating Corticosterone Levels of Young and Old Male and Female C57B1/6J Mice. *Journals of Gerontology* 1968; **23**: 522-&.
148. Hamann A, Flier JS, Lowell BB. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* 1996; **137**: 21-29.



149. McGinnis R, Walker J, Margules D, Aird F, Redei E. Dysregulation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis in Male and Female, Genetically-Obese (Ob/Ob) Mice. *Journal of Neuroendocrinology* 1992; **4**: 765-771.
150. Rhodes ME, Billings TE, Czambel RK, Rubin RT. Pituitary-adrenal responses to cholinergic stimulation and acute mild stress are differentially elevated in male and female M-2 muscarinic receptor knockout mice. *Journal of Neuroendocrinology* 2005; **17**: 817-826.
151. Moller CL, Raun K, Jacobsen ML, Pedersen TA, Holst B, Conde-Frieboes KW, Wulff BS. Characterization of murine melanocortin receptors mediating adipocyte lipolysis and examination of signalling pathways involved. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; **341**: 9-17.
152. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* 2008; **29**: 2959-2971.
153. Kloeting N, Stumvoll M, Blueher M. The biology of visceral fat. *Internist* 2007; **48**: 126-133.
154. Kiwaki K, Levine JA. Differential effects of adrenocorticotrophic hormone on human and mouse adipose tissue. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 2003; **173**: 675-678.
155. Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1996; **38**: 73-80.
156. Todaro GJ, Green H. Quantitative Studies of Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and Their Development Into Established Lines. *Journal of Cell Biology* 1963; **17**: 299-&.
157. Green H, Kehinde O. Established Pre-Adipose Cell Line and Its Differentiation in Culture .2. Factors Affecting Adipose Conversion. *Cell* 1975; **5**: 19-27.
158. Cho KJ, Shim JH, Cho MC, Choe YK, Hong JT, Moon DC, Kim JW, Yoon DY. Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 2005; **96**: 869-878.
159. Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 1999; **48**: 2255-2269.
160. Ockner RK, Manning JA, Kane JP. Fatty-Acid Binding-Protein - Isolation from Rat-Liver, Characterization, and Immunochemical Quantification. *Journal of Biological Chemistry* 1982; **257**: 7872-7878.
161. Glatz JFC, Storch J. Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Current Opinion in Lipidology* 2001; **12**: 267-274.
162. Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchettemackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of Lipid Research* 1997; **38**: 2249-2263.
163. LeBlanc SE, Konda S, Wu Q, Hu YJ, Oslowski CM, Sif S, Imbalzano AN. Protein Arginine Methyltransferase 5 (Prmt5) Promotes Gene Expression of Peroxisome

- Proliferator-Activated Receptor gamma 2 ( PPAR gamma 2) and Its Target Genes during Adipogenesis. *Molecular Endocrinology* 2012; **26**: 583-597.
164. Jitrapakdee S, Slawik M, Medina-Gomez G, Campbell M, Wallace JC, Sethi JK, O'Rahilly S, Vidal-Puig AJ. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates murine pyruvate carboxylase gene expression in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 2005; **280**: 27466-27476.

### 8 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Menschen danken, ohne deren direkte oder indirekte Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ich bedanke mich bei Prof. Reincke für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Felix Beuschlein für seine bereitwillige, freundliche und ermutigende Hilfe. Er hatte stets ein offenes Ohr für die großen und kleinen Probleme, die sich während der Entstehung dieser Arbeit auftraten.

Vielen Dank auch meinem Betreuer Dr. Marc Slawik für die Einarbeitung und unermüdliche Unterstützung bei der experimentellen Tätigkeit und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank dem Förderprogramm für Forschung und Lehre der LMU München unter Leitung von Prof. Heesemann für die Mitfinanzierung dieses Projekts und der Möglichkeit, einen breiten Einblick in verschiedene aktuelle Forschungsprojekte zu bekommen.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Frau Brigitte Mauracher richten, die mich seit dem ersten Händedruck herzlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir mit ihrer enormen Erfahrung nicht nur in Momenten experimenteller Schwierigkeiten zur Seite stand.

Auch der ganzen übrigen Arbeitsgruppe Beuschlein Dankeschön für die angenehme, kollegiale und lehrreiche Arbeitsatmosphäre.

Meiner Freundin Kathrin Rothe danke ich für ihre Beratung und Motivation im Rahmen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt vielen Dank meinen Eltern und meinen Brüdern für ihre immerwährende Unterstützung, Geduld und Zusprache.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Sauter, Andreas Philipp

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Evaluation Melanocortin-2-Rezeptor abhängiger Effekte auf das Fettgewebe in einem *in vivo*  
Modell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und  
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als  
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle  
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in  
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades  
eingereicht wurde.

München, 27.01.2015

Andreas Sauter